

Zelluläre Regulation des AT_{1a}-Rezeptors in aortalen glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III – Biologie und Vorklinische Medizin –
der Universität Regensburg



vorgelegt von

Birgül Kurt, Regensburg

Oktober 2007

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von November 2003 bis Oktober 2007 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Kurtz am Lehrstuhl für Physiologie I der Universität Regensburg.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 17.10.2007

Colloquium: 14.12.2007

Prüfungskommission:

(Vorsitzender)	Prof. Dr. R. Warth
(Erstgutachter)	Prof. Dr. A. Kurtz
(Zweitgutachter)	PD Dr. M. Bucher
(Drittprüfer)	Prof. Dr. J. Schlossmann

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Sepsis.....	2
1.1.1 Definition.....	2
1.1.2 Inzidenz und Epidemiologie.....	4
1.1.3 Pathophysiologie	4
1.2 Bakterien - Zellwände	5
1.2.1 Gram-positive Bakterien.....	5
1.2.2 Gram-negative Bakterien.....	6
1.2.2.1 Zellwand - Aufbau.....	6
1.2.2.2 Lipopolysaccharid	7
1.2.2.2.1 O-Antigen	8
1.2.2.2.2 Kern-Polysaccharid	8
1.2.2.2.3 Lipid A.....	8
1.3 Immunreaktion.....	9
1.3.1 Erkennung von LPS.....	9
1.3.2 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B	11
1.3.3 Proinflammatorische Mediatoren	12
1.3.3.1 Zytokine.....	12
1.3.3.1.1 Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- α).....	12
1.3.3.1.2 Interleukin-1 β (IL-1 β)	13
1.3.3.1.3 Interferon-gamma (IFN- γ).....	13
1.3.3.2 Cyclooxygenase-2 und Prostaglandine.....	14
1.3.3.3 Induzierbare NO-Synthase und Stickstoffmonoxid (NO)	15
1.3.4 Systemische Reaktion auf proinflammatorische Mediatoren.....	16
1.4 Systemische Vasodilatation und arterielle Hypotension bei Sepsis	17
1.4.1 Vermittlung der arteriellen Hypotension	
- Rolle des Stickstoffmonoxids -	17
1.4.2 Vermittlung der arteriellen Hypotension	
- Rolle des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) -	18
1.4.2.1 RAAS allgemein.....	18
1.4.2.2 RAAS bei Sepsis	19
1.4.2.2.1 In vivo - Befunde.....	19
1.4.2.2.2 In vitro - Versuche.....	20
1.5 Fragestellung	21

2. MATERIAL und METHODEN.....	23
2.1 MATERIAL	23
2.1.1 Plasmide.....	24
2.1.2 Oligonukleotide	25
2.1.3 Internetdienste und Software	27
2.1.4 Medien, Puffer und Lösungen	27
2.1.5 Enzyme, Chemikalien und Verbrauchsmaterial	29
2.1.6 Geräte.....	31
2.2 METHODEN.....	32
2.2.1 Kultivierung von Organismen und eukariontischen Zellkulturen	32
2.2.1.1 Anzucht von <i>E. coli</i> Bakterien.....	32
2.2.1.2 Anzucht und Kultivierung der AVSMC Zellen.....	32
2.2.2 Gentechnische Methoden	33
2.2.2.1 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
2.2.2.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus einer Ratten-Niere.....	33
2.2.2.1.2 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	33
2.2.2.1.3 DNA-Konzentrationsbestimmung	33
2.2.2.1.4 Isolierung von Total RNA aus eukariontischen Zellen	34
2.2.2.1.5 RNA-Konzentrationsbestimmung	34
2.2.2.2 Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion	35
2.2.2.2.1 Reverse Transkription.....	35
2.2.2.2.2 PCR mit dem Expand Long Template PCR System	35
2.2.2.2.3 Quantitative Polymerase Kettenreaktion	36
2.2.2.2.4 Erstellen von Mutations- und Deletions-Konstrukten durch Mutagenese-PCR.....	36
2.2.2.3 DNA-Sequenz-Analyse	37
2.2.2.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	37
2.2.2.5 Elution der DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen.....	37
2.2.2.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	37
2.2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten.....	38
2.2.2.8 Klonierung des 3,55kb großen AT _{1a} -Rezeptor Promotors in den pCR [®] 2.1-TOPO [®] -Vektor.....	38
2.2.2.9 Transformation von <i>E. coli</i>	38
2.2.2.10 Transfektion der AVSMC-Zellen.....	39
2.2.2.11 Luziferase-Test	39
2.2.3 Fluoreszenzmikroskopische Messung des intrazellulären Kalziums mit Hilfe von Fura-2	40

3. ERGEBNISSE.....	41
3.1 Zellkultur - Modell:	
aortale glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte	42
3.2 mRNA - Daten.....	43
3.2.1 Einfluß des Zytokin-Mix aus IFN- γ , IL-1 β und TNF- α	43
3.2.1.1 mRNA Expression des AT _{1a} -Rezeptors und der NOS II bei einem 24h-Zeitgang	43
3.2.1.2 mRNA Expression des AT _{1a} -Rezeptors und der NOS II bei einem 72h-Zeitgang	45
3.2.1.3 Konzentrations-abhängige mRNA Expression des AT _{1a} -Rezeptors und der NOS II	47
3.2.2 Einfluß der Zytokine einzeln bzw. in Kombination - mRNA Expression des AT _{1a} -Rezeptors und der NOS II nach 24h -	48
3.2.3 Rolle von Stickstoffmonoxid.....	50
3.2.3.1 Einfluß von SNAP	50
3.2.3.1.1 mRNA Expression des AT _{1a} -Rezeptors bei einem 24h-Zeitgang	50
3.2.3.1.2 Konzentrations-abhängige mRNA Expression des AT _{1a} -Rezeptors ..	51
3.2.3.2 Einfluß von L-NAME.....	52
3.2.4 Bedeutung der MAP-Kinase-Signaltransduktionswege	53
3.2.5 Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B.....	54
3.2.6 Stabilität der AT _{1a} -Rezeptor mRNA	56
3.3 Promotor-Daten	57
3.3.1 Generierung des Promotor-Konstrukts p3,55kb.....	57
3.3.1.1 Basale Promotor-Aktivität des p3,55kb-Plasmids.....	57
3.3.1.2 Regulation der Promotor-Aktivität des p3,55kb-Plasmids.....	59
3.3.1.2.1 Zytokin-Mix aus IFN- γ , IL-1 β und TNF- α	59
3.3.1.2.2 Zytokin-Kombinationen sowie der NO-Donor SNAP	60
3.3.2 Generierung von Deletions-Konstrukten - p3,55kb, p1,55kb, p0,20kb und p0,075kb -	61
3.3.2.1 Aktivität der Promotor-Konstrukte bei Gabe des Zytokin-Mix aus IFN- γ , IL-1 β und TNF- α	62
3.3.2.2 Aktivität der Promotor-Konstrukte bei Gabe des Zytokins IFN- γ	63
3.3.2.3 Aktivität der Promotor-Konstrukte bei Gabe des Zytokins TNF- α	64
3.3.2.4 Aktivität der Promotor-Konstrukte bei Gabe von NO.....	65
3.4 AT ₁ -Rezeptor vermittelte Ca ²⁺ -Freisetzung	66
3.4.1 Wirkung von Ang II zusammen mit PD123319 bzw. Losartan	66
3.4.2 Wirkung von Ang II bei Zytokin-behandelten Zellen	67

4. DISKUSSION.....	68
4.1 mRNA-Daten.....	69
4.2 Promotor-Daten	74
4.3 AT ₁ -Rezeptor vermittelte Ca ²⁺ -Freisetzung	79
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	80
6. LITERATURVERZEICHNIS	83
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	95
PUBLIKATIONEN	97
DANKSAGUNG	98
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	99

1. EINLEITUNG

1.1 Sepsis

Die Reaktion des Körpers auf eine generalisierte Infektion mit dem Nachweis von Mikroorganismen wird als Sepsis bezeichnet.

Das Krankheitsbild der Sepsis entsteht, indem eine an sich sinnvolle Abwehrreaktion des Körpers aus der Kontrolle physiologischer Inhibitormechanismen gerät und damit in überschießender und generalisierter Form nicht mehr nur die auslösenden Pathogene bekämpft, sondern auch eine Schädigung körpereigener Zellen und sogar Organe verursacht (Schuster und Müller-Werdan, 1999).

1.1.1 Definition

Das klinische Bild der Sepsis wurde bereits von Hippokrates (460-377 v. Chr.) als "Wundfäule" eingeführt, wobei „die Krankheit tödlich“ verläuft, „wenn der Körper innerlich heiß und außen kalt ist“.

Eine Definition von Rudolf Virchow (1856) lautet: „Die inficirenden, faulenden Säfte dringen in die Gewebelemente ein, wahrscheinlich meist in Folge specifischer Affinität der Stoffe, und erregen in ihnen neue Entwicklungsvorgänge, ganz nach Art des Samens“.

Die klassische Definition der Sepsis geht auf Schottmüller aus dem Jahre 1914 zurück:

“Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen und zwar derart, daß durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“

Nach heutigem Verständnis ist die Sepsis „... die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Keime und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen“ (Schuster und Müller-Werdan, 1999).

Die aktuelle Definition der Sepsis wurde 1992 auf einer internationalen Konsensus-Konferenz von zwei großen amerikanischen Fachgesellschaften, dem American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM), festgelegt (ACCP/SCCM, 1992).

Weiterhin erfolgt eine Einteilung der Sepsis je nach Schweregrad in Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock.

Die Definitionen der Sepsisformen finden sich in Tabelle 1.1.

Begriff	Definition
Sepsis	eine systemische Reaktion auf eine Infektion, die durch 2 oder mehr der folgenden Symptome gekennzeichnet ist: <ol style="list-style-type: none"> 1. Körpertemperatur > 38,0°C oder < 36,0°C 2. Herzfrequenz > 90/min 3. Atemfrequenz > 20/min oder $p_a\text{CO}_2 < 32 \text{ mm Hg}$ 4. Leukozyten > 12000/mm³ oder < 4000/mm³, oder > 10% unreife (stabförmige) Formen
schwere Sepsis	Sepsis, assoziiert mit Organdysfunktion, Minderperfusion, oder Hypotonie. Die Hypoperfusion kann sich z.B. als Hypoxämie, Oligurie, Laktazidose oder akute Verwirrtheit präsentieren.
septischer Schock	schwere Sepsis + arterielle Hypotension trotz adäquater Flüssigkeitszufuhr: systolischer Druck < 90 mm Hg, mittlerer Druck < 60 mm Hg oder Abfall des systolischen Drucks > 40 mm Hg des Ausgangswertes.

Tabelle 1.1 Diagnosekriterien für Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock (mod. nach 19) entsprechend den ACCP/SCCM Konsensus-Konferenz Kriterien

Abzugrenzen vom Begriff der Sepsis ist der des SIRS („Systemic Inflammatory Response Syndrome“), einer systemischen Entzündungsreaktion, die zwar ebenfalls durch zwei oder mehr der oben genannten Symptome der Sepsis charakterisiert ist, jedoch nicht durch eine Infektion, sondern durch verschiedene schwere klinische Insulte wie Trauma, Verbrennungen, Pankreatitis und andere hervorgerufen wird.

1.1.2 Inzidenz und Epidemiologie

Trotz aller Fortschritte der modernen Medizintechnik und der Entwicklung neuer Medikamente hat sich im 20. Jahrhundert die Letalität der Sepsis und des septischen Schocks kaum verändert.

Auch heute noch sind Sepsis und septischer Schock mit einer hohen Sterblichkeit assoziiert und auf nicht kardiologischen Intensivstationen die häufigste Todesursache (Brun-Buisson et al., 1995).

Die Prävalenz der Sepsis in den USA wird auf ca. 750.000 pro Jahr geschätzt (Angus et al., 2001). Mit einer Inzidenz von ca. 3 auf 1.000 Einwohner ist die Sepsis eine häufigere Erkrankung als der Darmkrebs, der Brustkrebs oder AIDS.

In den USA versterben ca. 215.000 Menschen jährlich an den Folgen einer Sepsis, vergleichbar der Sterblichkeit bei akutem Herzinfarkt. Die geschätzten Krankenhauskosten betragen ca. 16,7 Milliarden Dollar.

Allein in Deutschland erkranken jedes Jahr zwischen 44.000 und 95.000 Menschen an schwerer Sepsis, und 30–50% dieser Patienten versterben während ihres Krankenhausaufenthalts (Moerer und Burchardi, 2004). Die jährlichen Behandlungskosten werden hierzulande auf 1,1 bis 2,45 Milliarden Euro geschätzt.

1.1.3 Pathophysiologie

Unter normalen Umständen ist das Immunsystem des Körpers in der Lage, eingedrungene Erreger (Bakterien, Pilze oder Protozoen) durch verschiedene Mechanismen in Schach zu halten.

Jedoch kann sich aus zunächst harmlosen infektiösen Entzündungen eine Sepsis entwickeln, wenn eine oder mehrere von den nachfolgenden vier Bedingungen vorliegen:

- eingeschränkte Immunabwehr
- massive Infektion mit vielen oder aggressiven Erregern
- Eindringen der Erreger in strukturell schlecht geschützte Körperregionen (beispielsweise Bauchhöhle, Gehirn, Lunge)
- fehlende Behandlung und schrittweises Überwinden der Immunabwehr.

Wenn es dem Körper nicht gelingt, eine Infektion auf den Ursprungsort zu begrenzen (etwa bei der Lungenentzündung auf die Lunge oder bei einer Mandelentzündung auf die

Mandeln), kommt es in der Folge, meist über den Blutkreislauf, zu einer Ausbreitung der Infektion auf den gesamten Körper.

Die außer Kontrolle geratene Entzündungsreaktion des Immunsystems führt im Körper zu Schwellungen, Durchblutungsstörungen und Sauerstoffmangel, ohne daß sie der Erregerbekämpfung nützte.

Sind einmal lebenswichtige Organe davon betroffen, kann der daraus folgende Verlust ihrer Funktionsfähigkeit schnell zum eigentlichen begrenzenden Faktor für das Überleben der Patienten werden.

Die Sepsis wird zu 4-16% polymikrobiell oder durch Pilze, zu 10% durch unbekannte Erreger, zu 6-24% durch Gram-positive Bakterien und zu 30-80% durch Gram-negative Bakterien hervorgerufen (Glauser et al., 1991).

1.2 Bakterien - Zellwände

Die Zellwand der Bakterien enthält als wesentlichen Baustein ein netzwerkartig angelegtes und als Sack ausgebildetes Makromolekül (Sacculus), das entweder als Peptidoglykan (PG) oder als Murein bezeichnet wird.

Die Evolution hat Eubakterien mit zwei ultrastrukturell verschiedenen Zellwandaufbau-Prinzipien hervorgebracht.

Mittels eines Färbeverfahrens nach Gram lassen sich Keime je nach Zellwand-Architektur in Gram-positive und Gram-negative Bakterien differenzieren.

1.2.1 Gram-positive Bakterien

Gram-positive Bakterien besitzen ein der Membran aufgelagertes dickes (20-28 nm), mehrschichtiges Peptidoglykan-Netzwerk, das als Zellwand-Hauptstrukturkomponente die Zelle umgibt. Ihre Dicke kann diejenige der PG-Schicht von Gram-negativen Bakterien bis zum 40-fachen übertreffen. Die Zellwand stellt in diesem Falle bis zu 70% des Trockengewichts dar.

Ein funktionell bedeutsamer Bestandteil der Zellwand Gram-positiver Bakterien ist die Lipoteichonsäure, die in der Außenseite der Zytoplasma-Membran verankert ist.

Sie kann durch Komplementaktivierung eine Entzündungsreaktion hervorrufen.

1.2.2 Gram-negative Bakterien

1.2.2.1 Zellwand - Aufbau

Im Gegensatz zu Gram-positiven Bakterien besitzen die Gram-negativen nur eine sehr dünne Mureinschicht (2 nm).

Der Zellwandaufbau unterscheidet sich auch darin, daß der Mureinsacculus von einer äußeren Membran begrenzt wird (Charakteristikum der Gram-negativen Zellwand).

Die äußere Membran enthält u. a. Lipoprotein, Phospholipide und Lipopolysaccharide (LPS) (Abb. 1.1). LPS spielt eine essentielle Rolle bei der bakteriellen Erkennung und ist hauptverantwortlich für die Aktivierung der angeborenen Immunität durch Gram-negative Bakterien.

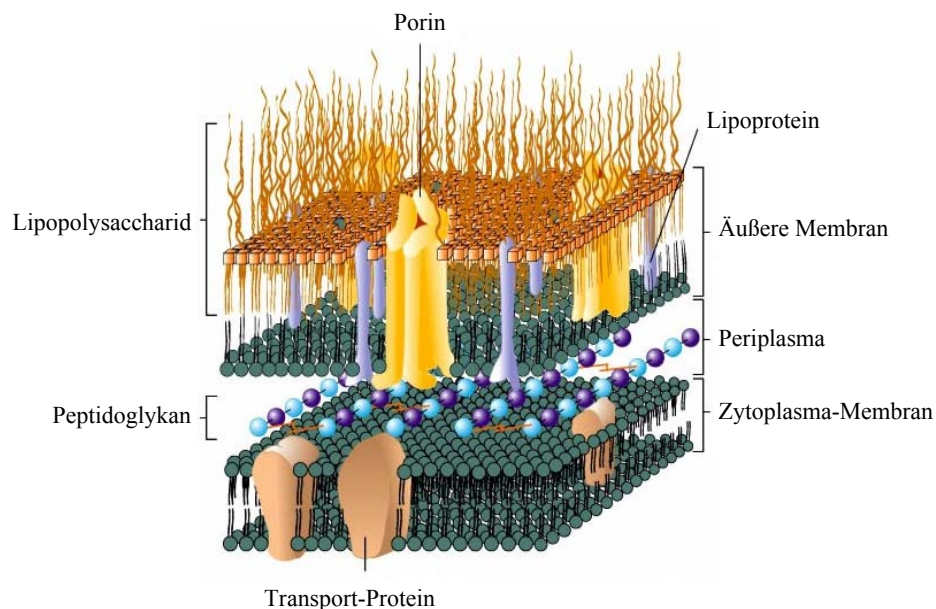


Abb. 1.1 Schematische Darstellung des Zellwandaufbaus Gram-negativer Bakterien mit typischen Bestandteilen

1.2.2.2 Lipopolysaccharid

Lipopolysaccharid ist ein thermostabiles Glykolipid, das sich aus einem hydrophoben Lipidanteil und einer kovalent gebundenen hydrophilen Polysaccharid-Region zusammensetzt.

Die historische Bezeichnung für LPS lautet Endotoxin. Sie ist in doppelter Weise irreführend, da es erstens nicht in den Bakterien vorliegt und zweitens im pharmakologischen Sinn kein Gift darstellt. Endotoxin ist ein integraler, evolutionär stark konservierter Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und wird hauptsächlich bei Zellteilung oder Lyse der Bakterien freigesetzt. Da LPS von den Bakterien nicht aktiv abgegeben wird, wurde es als endogener Stoff verstanden und den Exotoxinen, die sezerniert werden, gegenüber gestellt (Pfeiffer, 1892).

Die folgende Abbildung gibt einen schematischen Überblick über die Struktur von LPS.

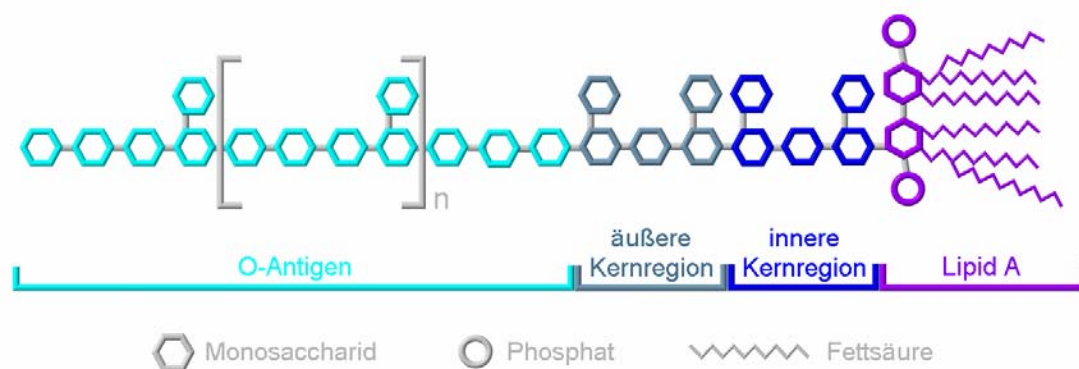


Abb. 1.2 Chemische Struktur von LPS

LPS besteht aus dem Polysaccharidanteil (O-Antigen, äußere Kernregion, innere Kernregion) und Lipid A. Das O-Antigen wird aus bis zu 50 (n) Oligosacchariden, die sich aus drei bis acht verschiedenen Einzelzuckern zusammensetzen, gebildet. Der äußere Kern enthält die häufig vorkommenden Saccharide Glukose, Galaktose, Glukosamin und Galaktosamin, während der innere Kern den in der Natur selten synthetisierten Zucker Ketodesoxyoctonsäure (Kdo) und Heptosereste, die phosphoryliert sein können, enthält. Das Grundgerüst des Lipid A ist ein phosphoryliertes Glukosamindisaccharid, welches vier Fettsäurereste trägt, von denen zwei wiederum sekundär acyliert sind.

Es lassen sich drei Regionen des Moleküls voneinander abgrenzen (Alexander et al., 2001; Heine et al., 2001):

das O-Antigen, ein Kern-Polysaccharid und das Lipid A.

1.2.2.2.1 O-Antigen

Das O-Antigen ist aus einer unterschiedlichen Anzahl von Wiederholungen einer Oligosaccharideinheit zusammengesetzt, die aus 2 bis 8 Zuckermonomeren besteht.

Es besteht eine große Variationsbreite in Beschaffenheit und Länge bei verschiedenen Bakterienstämmen, die die Möglichkeit bietet, unterschiedliche Spezies anhand ihres O-Antigens serologisch zu klassifizieren. Dabei stellen die Bezeichnungen der Bakterienstämme immunologische Klassifizierungen dar, die angeben, welcher Antikörper welchen Stamm erkennt. Zwar benötigen Bakterien für das Überleben *in vivo* ein O-Antigen, *in vitro* dagegen können sie auch ohne überleben.

Varianten mit kurzem O-Antigen werden als rauhe Form („rough“-) bezeichnet, diejenigen mit langen O-spezifischen Seitenketten als glatte Form („smooth“), weil glänzende Oberflächen ihre Kolonien kennzeichnen. Das lange O-Antigen der glatten Form stellt einen potenten Virulenzfaktor dar, der Resistenz gegen Komplementfaktoren vermittelt (McCallum et al., 1989). Das O-Antigen ist allerdings nicht notwendig für die Entzündungsaktivität des LPS.

1.2.2.2.2 Kern-Polysaccharid

Wie das O-Antigen ist auch das Kern-Polysaccharid nicht notwendig für die entzündungsfördernde Eigenschaft von LPS.

Es besteht aus 10 oder mehr unterschiedlichen Zuckermolekülen und einer variablen Anzahl an Phosphat- und Ethanolamin-Resten. Es liegt zwischen dem O-Antigen und dem Lipid A. Kernregion und O-Antigen bilden den hydrophilen Teil des amphiphilen Lipopolysaccharids.

1.2.2.2.3 Lipid A

Für die biologische Wirkung des LPS ist das Lipid A verantwortlich (Rietschel et al., 1985 und 1987), das auch als Anker dient, um das LPS-Molekül in der äußeren Bakterienmembran zu befestigen.

Es ist zusammengesetzt aus zwei Glukosamin-Phosphat-Resten, an denen meistens sechs Fettsäureketten gebunden sind, die eine Länge von etwa 12 bis 14 C-Atomen aufweisen. Diese Region und auch die Enzyme seiner Biosynthese sind bei Enterobacteriaceae hoch konserviert. Mutationen sind in den meisten der Lipid-A-Biosynthese-Genen tödlich (Onishi et al., 1996).

Für die endotoxische Aktivität des Lipid A spielt neben der Anzahl, Position und der Kettenlänge der Fettsäuren auch die Form des Lipid A eine entscheidende Rolle (Somerville et al., 1996).

Wenn Gram-negative Bakterien sich vermehren oder sterben, wird LPS und somit Lipid A freigesetzt (Freudenberg et al., 1991). LPS ist eine der stärksten bioaktiven Substanzen überhaupt; es ruft im Organismus schon bei niedrigsten, pikomolaren Konzentrationen heftige Immunreaktionen hervor.

1.3 Immunreaktion

Die Erkennung von bakteriellen Pathogenitäts-Faktoren durch das angeborene Immunsystem ist Voraussetzung für die Induktion einer adäquaten Immunantwort, die zur Beseitigung des eingedrungenen Pathogens führen soll.

Lipopolysaccharid ist ein starker Aktivator des Immunsystems, wobei die wesentlichen Zielzellen die Monozyten/Makrophagen sind. Diese immun-kompetenten Zellen werden über spezifische Oberflächenrezeptoren aktiviert.

1.3.1 Erkennung von LPS

Freies Endotoxin bindet an das Serumprotein „Lipopolysaccharid-bindendes Protein“ (LBP). Wesentlicher LPS-bindender Rezeptor auf den Monozyten ist der CD14 Rezeptor, an den der Komplex aus LPS und LBP bindet. Nach Bindung des LPS/LBP-Komplexes an den CD14-Rezeptor kommt es zu einer Aggregation des CD14-Rezeptors, eines Adapterproteins MD2 und des Toll-like-Rezeptors 4 (TLR-4), der für die transmembranöse Signaltransduktion verantwortlich ist (Poltorak et al., 1998; Rensing und Bauer, 2001).

Die Bindung des Liganden an TLR-4 führt zur Konformationsänderung der intrazellulären Domäne mit nachfolgender Rekrutierung von Adapterproteinen, die sich an der intrazellulären Domäne des Toll-Rezeptors anlagern (Abb. 1.3).

Das zentrale Adaptermolekül des TLR ist das Myeloid-Differenzierungsprotein (MyD88). Nach Rekrutierung von MyD88 kommt es zur Bindung und damit zur Autophosphorylierung der Serin-Threonin Kinase IRAK (IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase) (Palsson-McDermott und O'Neill, 2004).

Durch diese Autophosphorylierung löst sich IRAK vom Rezeptor-Komplex und interagiert nun mit TRAF6 (TNF Rezeptor assoziierter Faktor 6).

Die nachfolgende Signaltransduktion kann in verschiedene Richtungen laufen.

Ein Signalweg, der von TRAF6 ausgehen kann, ist die Aktivierung von Proteinkinasen der Familie der MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) (Kopp et al., 1999).

Dies führt schließlich zur Induktion von Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 (Aktivator Protein-1) und Elk-1 (Elk-1 member of ETS oncogene family), welche die Expression verschiedener Gene der Immunantwort regulieren (Guha und Mackman, 2001).

Ein weiterer Signalweg aktiviert über die Kinase TAK1 (transforming growth factor- β activated kinase) die I- κ B -Kinasen α und β , welche zusammen mit IKK γ den sog. IKK-Komplex bilden. Dieser IKK-Komplex phosphoryliert das Inhibitorprotein κ B (I- κ B), welches mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B (Nuklear Faktor κ B) assoziiert vorliegt. Durch diese Phosphorylierung löst sich der Inhibitor vom Nuklear Faktor κ B und ermöglicht so die Translokation von NF- κ B in den Zellkern. Aktivierung des Nuklear Faktors κ B führt zu einer exzessiven Produktion proinflammatorischer Mediatoren (Senftleben und Karin, 2002).

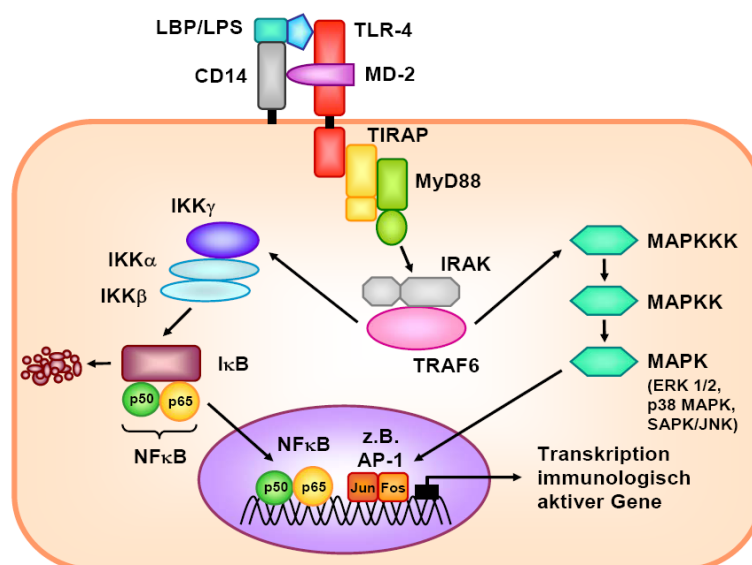


Abb. 1.3 Signaltransduktion über den Toll-like-Rezeptor-4

Die Bindung des Liganden an TLR-4 führt zur Assoziation der Adaptermoleküle TIRAP, MyD88, IRAK und TRAF6.

Durch Aktivierung des IKK-Komplexes wird das inhibitorische Protein I- κ B phosphoryliert und abgebaut, wodurch der Transkriptionsfaktor NF- κ B freigesetzt wird und in den Zellkern translozieren kann.

TRAF6 aktiviert auch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (ERK 1/2, p38 MAPK und SAPK/JNK), die ihrerseits verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 phosphorylieren.

Die aktivierten Transkriptionsfaktoren leiten im Zellkern die Transkription immunologisch aktiver Gene ein.

1.3.2 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

Die Transkription - Synthese von messenger-RNA aus der DNA im Zellkern - wird von Proteinen kontrolliert, die als Transkriptionsfaktoren bezeichnet werden.

NF- κ B als Transkriptionsfaktor wurde erstmals als Regulator bei der Expression von kappa-Leichtketten in B-Lymphozyten identifiziert (Sen und Baltimore, 1986).

Mittlerweile weiß man, daß NF- κ B ein im Organismus ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor ist, der eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Prozessen spielt.

NF- κ B ist ein dimerer Transkriptionsfaktor, dessen Untereinheiten aus Proteinen der Rel-Familie bestehen. Derzeit sind fünf Mitglieder der NF- κ B Familie in Säugetieren identifiziert, welche NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), Rel A (p65), Rel B und c-Rel einschließen (Baldwin, 1996). Die Mitglieder dieser Rel-Familie zeichnen sich alle durch eine gemeinsame Rel-Homologiedomäne aus, welche für die DNA-Bindung, die Interaktion mit dem Inhibitorprotein κ B (I- κ B) und die Dimerisierung verantwortlich ist (Phelps et al., 2000).

Rel A, Rel B und c-Rel werden auch als Rel-Proteine bezeichnet und enthalten - im Gegensatz zu NF- κ B1 und NF- κ B2 - neben der Rel-Homologie-Domäne auch noch mindestens eine Transaktivierungsdomäne.

Obwohl viele verschiedene Dimere möglich sind, beobachtet man sehr häufig eine Kombination aus einem Nicht-Rel-Protein (NF- κ B1 oder NF- κ B2) und einem Rel-Protein; klassisches Beispiel ist das p50/RelA-Heterodimer.

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt zu einer Hochregulation von Zielgenen, die bei der Entstehung und Perpetuierung einer Entzündungsreaktion beteiligt sind.

Zu den Zielgenen, die von NF- κ B reguliert werden, gehören unter anderem die Zytokine TNF- α und IL-1 β (Collins et al., 1995; Senftleben und Karin, 2002). Aber auch die Genexpression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) (Crofford et al., 1997; Newton et al., 1997) und der induzierbaren NO-Synthase (iNOS / NOS II) (Xie et al., 1994) werden über NF- κ B reguliert.

1.3.3 Proinflammatorische Mediatoren

1.3.3.1 Zytokine

Pathogene induzieren über Monozyten und Makrophagen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der zu einer exzessiven Produktion proinflammatorischer Zytokine führt.

Zytokine sind Proteine bzw. Glykoproteine, die der Kommunikation und Interaktion von Immun-Zellen dienen und somit bei der Induktion und Regulation von Entzündungsprozessen eine entscheidende Rolle spielen.

Nachfolgend werden einzelne Zytokine vorgestellt, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

1.3.3.1.1 Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- α)

TNF- α ist ein nicht-glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 17 kDa (Goeddel et al., 1986).

Die aktive Form ist das Homotrimer, während Monomere nicht aktiv sind.

Bei TNF- α handelt es sich um ein hochwirksames Zytokin, das nach Kontakt mit einem Pathogen oder anderen Zytokinen bevorzugt in Makrophagen, Lymphozyten, NK-Zellen und neutrophilen Granulozyten gebildet wird und seine Wirkungen sowohl lokal als auch systemisch ausübt (Aggarwal und Natarajan, 1996; Männel et al., 1990).

In niedrigen Konzentrationen dient TNF- α der autokrinen und parakrinen Regulation von Entzündungszellen im Gewebe. Mittels der durch TNF- α initiierten Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und der Aktivierung eingewanderter Leukozyten kommt es zur weiteren Zytokin-Ausschüttung und zur Akkumulation von Entzündungszellen am Ort der Inflammation (Vassalli, 1992).

In größeren Mengen kann TNF- α in den Blutkreislauf gelangen und so systemisch wirksam werden. Dies führt u.a. durch Temperatursollwertverstellung im Hypothalamus zur Fieberinduktion und zur Ausschüttung weiterer Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) und IL-6. Weiterhin beeinflusst TNF- α die Gerinnung, bewirkt eine katabole Stoffwechsellaage und führt direkt - oder indirekt durch Induktion von Mediatoren wie Stickstoffoxid (NO) - über die Reduktion des Gefäßmuskeltonus und der Myokardkontraktilität zur Abnahme des Blutdrucks.

Bei massiver TNF- α -Ausschüttung kann es so zu verminderter Gewebeperfusion und zu Gerinnungsstörungen bis hin zum Multiorganversagen und Schock kommen (Vassalli, 1992; Parrillo, 1993; Hack et al., 1997).

Darüber hinaus übt TNF- α auch eine zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen aus, woraufhin dieses Zytokin seinen Namen erhalten hat.

1.3.3.1.2 Interleukin-1 β (IL-1 β)

IL-1 β ist ein nicht-glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 17 kDa (Dinarello, 1997).

Bei seiner Synthese entsteht zunächst Pro-IL-1 β (ca. 31 kDa), von dem dann IL-1 β durch das Interleukin-Converting-Enzym (ICE) abgespalten wird (Thornberry et al., 1992).

Gebildet und freigesetzt wird IL-1 β hauptsächlich von Monozyten bzw. Makrophagen, jedoch sind auch neutrophile Granulozyten, Fibroblasten, Gefäßendothelzellen und Keratinozyten in der Lage, IL-1 β zu produzieren. Es gibt viele Stimuli, die zur Freisetzung von IL-1 β in die Umgebung bzw. ins Blut führen, darunter z.B. der Kontakt mit Mikroorganismen, Endotoxinen oder anderen Zytokinen. Zwei Typen von Interleukin-1-Rezeptoren, IL-1-Rezeptor Typ I (IL-1R1) und Typ II (IL-1R2), die sich an den Membranen verschiedenster Zielzellen befinden (Sims und Dower, 1994), vermitteln die einzelnen Wirkungen von IL-1 β , welche sich zum großen Teil mit denen des TNF- α decken. IL-1 β mobilisiert und aktiviert Effektorzellen (z.B. Makrophagen, neutrophile Granulozyten) und induziert die Produktion bzw. Freisetzung von weiteren Entzündungsmediatoren (z.B. Zytokine, Akute-Phase-Proteine, Prostaglandine, reaktive Sauerstoff- und Stickstoffderivate).

1.3.3.1.3 Interferon-gamma (IFN- γ)

Bei IFN- γ handelt es sich um ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 17 kDa.

Es wird in T-Lymphozyten und NK-Zellen produziert und von diesen nach Aktivierung durch Zytokine freigesetzt (Schroder et al., 2004). Rezeptoren für IFN- γ befinden sich auf vielen hämatopoetischen Zellen wie B- und T-Lymphozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen, aber auch auf Endothelzellen. Obwohl Interferone vorwiegend bei der Regulierung spezifischer Immunantworten eine Rolle spielen, sind sie auch im Bereich der unspezifischen Abwehr von Bedeutung, wenn sie von NK-Zellen sezerniert werden (Trinchieri, 1989). IFN- γ steigert die Tätigkeit von Makrophagen und

neutrophilen Granulozyten (Boehm et al., 1997) und damit die Freisetzung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies.

Bei der Freisetzung der Zytokine nach einem Entzündungsreiz wird eine gewisse zeitliche Reihenfolge eingehalten. TNF- α und IL-1 β werden zuerst sezerniert, auf deren Reiz hin weitere Zytokine und im weiteren Verlauf auch sekundäre Entzündungsmediatoren (z.B. Prostanoid, Stickstoffmonoxid) folgen.

1.3.3.2 Cyclooxygenase-2 und Prostanoid

Cyclooxygenasen (COX) sind bifunktionelle Membranproteine, welche unter Einbau von 2 Sauerstoffmolekülen die Bildung von Prostaglandinen, Prostazyklin und Thromboxan A₂ aus der Arachidonsäure katalysieren (Smith et al., 2000) (Abb. 1.4).

Dabei werden zwei Reaktionsschritte unterschieden, die durch unterschiedliche Domänen des Cyclooxygenase-Proteins katalysiert werden:

- Die Cyclooxygenasereaktion, bei der es zur Ausbildung des C-5 Ringsystems kommt und bei der das Prostaglandin-G₂ (PGG₂) entsteht, und
- Die Peroxidasereaktion, bei der die Peroxidfunktion am C-15 zum Alkohol reduziert wird; das Reaktionsprodukt wird als Prostaglandin-H₂ (PGH₂) bezeichnet.

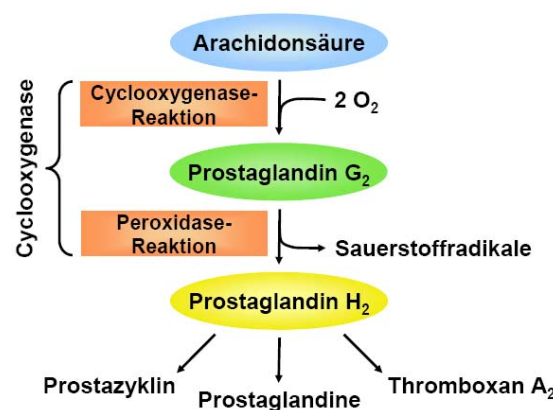


Abb. 1.4 Synthese von Prostaglandinen, Prostazyklin und Thromboxan A₂ aus Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase

Von der Enzymfamilie der Cyclooxygenasen existieren 3 Isoformen (COX-1, COX-2 und COX-3), die sich darin unterscheiden, ob sie konstitutiv exprimiert oder nur bei Bedarf induziert werden.

Die COX-2 ist die induzierbare Isoform dieser Enzymfamilie und wird in vielen Zelltypen (Monozyten, Endothelzellen oder Fibroblasten) durch Entzündungsmediatoren wie LPS (Lee et al., 1992) und Zytokine (TNF- α , IL-1 β) induziert (Lyons-Giordano et al., 1993; Topley et al., 1994).

Über COX-2 werden verschiedene Prostaglandine wie das Prostaglandin-E₂ oder Prostazyklin synthetisiert. Ihren Namen erhielten die Prostaglandine, weil sie zunächst im Sekret der Prostata (Vorstehdrüse) entdeckt wurden. Wie man jedoch heute weiß, handelt es sich bei den Prostaglandinen um Gewebshormone, die nahezu in allen Organen vorkommen. Sie nehmen Einfluss auf viele Vorgänge im Körper, unter anderem auf Schmerzzustände, Entzündungen und die Weitstellung von Blutgefäßen.

1.3.3.3 Induzierbare NO-Synthase und Stickstoffmonoxid (NO)

Die NO-Synthasen katalysieren die Umwandlung der Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin und produzieren dabei Stickstoffmonoxid (Moncada et al., 1991; Nathan und Xie, 1994) (Abb. 1.5).

Es existieren 3 Isoformen – NOS I, NOS II und NOS III – die sich u.a. darin unterscheiden, ob sie konstitutiv exprimiert oder bei Bedarf induziert werden.

Die konstitutiven NO-Synthasen (NOS I in Nervenzellen, NOS III in Endothelzellen) haben homöostatische Regulationsaufgaben für Blutfluß, Plättchenfunktion und Signalübertragung im Nervensystem; die NO-Freisetzung der konstitutiven Isoenzyme wird durch Beeinflussung der Enzymaktivität gesteuert.

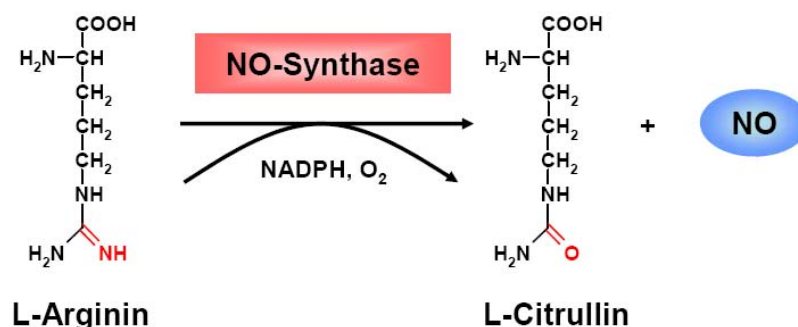


Abb. 1.5 Schema der NO-Synthase Reaktion

Im Gegensatz zu den konstitutiven NO-Synthasen wird die NOS II nur bei Bedarf exprimiert (Förstermann et al., 1994; Nathan, 1992; Pfeilschifter et al., 1996). Inzwischen ist bekannt, daß viele verschiedene Zelltypen dazu in der Lage sind, die NOS II zu exprimieren, z.B. Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Muskelzellen. Die induzierbare NO-Synthase wird im Rahmen entzündlicher Prozesse *de novo* synthetisiert. Der Synthesereiz geht von verschiedenen Entzündungsmediatoren aus, darunter LPS (Ermert et al., 2002; Hickey et al., 1997; Hollenberg et al., 2000) und auch Zytokine (Robbins et al., 1994). Stickstoffmonoxid ist ein wichtiger Mediator des Immunsystems. Die Synthese von NO, einem einfachen Radikal mit vielfältigen Funktionen in physiologischen und pathologischen Prozessen, stellt einen unspezifischen Mechanismus der Immunantwort dar; NO wirkt vasodilatierend und antithrombotisch und spielt damit am Entzündungsort eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Durchblutung und der Blutgerinnung (Clancy et al., 1998; Kroncke et al., 1995).

1.3.4 Systemische Reaktion auf proinflammatorische Mediatoren

Ein stark erhöhter systemischer LPS-Spiegel im Blut kann beim Menschen zu einer unkontrollierten, extremen Aktivierung von Entzündungsmediatoren führen. Dies setzt eine Mediatorkaskade in Gang, die zur Sepsis führen kann.

Zytokine sind vorteilhaft für den Organismus, solange sie in geringen Ausmaßen und begrenzt auf einen lokalen Entzündungsherd sezerniert werden. Dann stimulieren sie das Abwehrsystem dazu, eindringende Krankheitserreger zu zerstören.

Bei der Endotoxinämie werden sie aber systemisch ausgeschüttet und bergen so das Risiko, die Homöostase des Organismus schwer zu stören.

Diejenigen Reaktionen, welche bei der lokalen Entzündung vorteilhaft für die Bekämpfung der Infektion waren, stellen sich systemisch als Nachteil heraus:

Vasodilatation und erhöhte Kapillarpermeabilität verursachen Hypovolämie und Hypotension und in Folge einen septischen Schock.

1.4 Systemische Vasodilatation und arterielle Hypotension bei Sepsis

Der septische Schock, die schwerste Form der Sepsis, ist definiert als Sepsis mit einem Kreislaufversagen aufgrund einer arteriellen Hypotonie und einem Multiorganversagen (Parrillo, 1993).

Das Ausmaß der arteriellen Hypotension korreliert dabei mit dem Ausmaß des Multiorganversagens und dieses wiederum mit der Mortalitätsrate (Beal und Cerra, 1994). Das therapeutische Ziel ist daher, eine Stabilisierung des Blutdrucks zu erreichen, indem der Perfusionsdruck durch eine adäquate Volumensubstitution in Kombination mit Vasokonstriktoren erhöht wird.

Die Blutdruckwirksamkeit von Katecholaminen ist jedoch während Sepsis deutlich eingeschränkt (Nelson et al., 1991; Schaller et al., 1985).

Darüber hinaus ist auch die Blutdruckantwort auf andere Vasokonstriktoren wie Vasopressin und Angiotensin II während Sepsis reduziert (Tarpey et al., 1998; Hollenberg et al., 1997).

Die Ursachen für diese vaskuläre Hyporeaktivität auf Vasokonstriktoren, auch Vasoplegie genannt, sind derzeit nicht schlüssig bekannt.

1.4.1 Vermittlung der arteriellen Hypotension

- Rolle des Stickstoffmonoxids -

Bei der Entstehung der arteriellen Hypotension während Sepsis wird Stickstoffmonoxid eine maßgebliche Rolle zugeordnet. Die Gabe von Lipopolysaccharid (LPS) führt über eine vermehrte Expression der NOS II in nahezu allen Organen zu einer überschießenden Bildung von NO (Liu et al., 1993), was eine Vasodilatation mit Blutdruckabfall zur Folge hat (Moncada et al., 1991).

Im Tierversuch wurde eine Aufhebung der Sepsis-induzierten arteriellen Hypotension durch Hemmung der NO-Synthese beschrieben (Teale und Atkinson, 1994).

Eine große Multicenterstudie wurde jedoch wegen einer erhöhten Mortalität bei Patienten, die mit dem unspezifischen NOS-Inhibitor L-Nitrosoaminomethylester (L-NAME) behandelt wurden, gestoppt.

Darüber hinaus belegen mehrere Untersuchungen, daß die arterielle Hypotension sowie auch die vaskuläre Hyporeaktivität während Sepsis durch Hemmung der NO-Synthese nicht oder nur unvollständig aufgehoben werden können (Bucher et al., 2001; Fox et al., 1994; Pedoto et al., 1998; Scott und McCormack, 1999; Thiemermann et al., 1993).

Diese Befunde weisen darauf hin, daß zusätzlich zur vasodilatierenden Wirkung von NO weitere Mechanismen zur vaskulären Hyporeaktivität beitragen könnten. So könnte auf der Seite der Vasokonstriktoren die Signaltransduktion gestört sein.

1.4.2 Vermittlung der arteriellen Hypotension

- Rolle des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) -

1.4.2.1 RAAS allgemein

Die Aufrechterhaltung eines bestimmten Blutdruckes ist für das Funktionieren des menschlichen Organismus von lebenswichtiger Bedeutung.

Ist der Blutdruck zu niedrig, so kann das Blut möglicherweise nicht alle Organe erreichen. Diese werden dann nicht ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Die Folge wäre eine Funktionseinschränkung, Organversagen oder der Tod (z.B. bei einem Schock). Die Höhe des Blutdrucks wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. In erster Linie hängt der Blutdruck natürlich von der Schlagkraft des Herzens ab. Je mehr Blut das Herz in die Gefäße pumpt, desto höher ist der Blutdruck. Aber auch der Durchmesser der Gefäße und damit der Widerstand, der sich dem Blutstrom entgegenstellt sowie die Gesamtmenge des zirkulierenden Blutes spielen eine wichtige Rolle.

Reguliert wird der Blutdruck über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, welches eines der wichtigsten Systeme zur Regulation des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens, des Salzhaushaltes und des Blutdrucks (Churchill, 1995) ist.

Angiotensin II (Ang II) - zentrales Hormon in diesem System - ist einer der stärksten endogenen Vasokonstriktoren und vermittelt seine vasopressorische Wirkung über Angiotensin II Typ 1 (AT₁)-Rezeptoren (De Gasparo et al., 2000) (Abb. 1.6).

Dabei gibt es vom AT₁-Rezeptor in Nagetieren zwei Untertypen (AT_{1a} und AT_{1b}), im Menschen ist dagegen nur ein Typ dieses Rezeptors bekannt.

Daneben gibt es auch noch den AT₂-Rezeptor, dem jedoch eine antagonistische Wirkung zugeschrieben wird.

Ang II hat zur Folge, daß sich die Gefäße - durch Kalzium (Ca²⁺) -Einstrom aus intrazellulären Speichern in das Zytosol - verengen und daß das sympathische Nervensystem aktiviert wird.

Die nachfolgende Freisetzung des Hormons Aldosteron aus der Nebenniere führt dazu, daß die Wasser- und Blutmenge im Körper zunimmt. Alle diese Faktoren lassen den Blutdruck ansteigen.

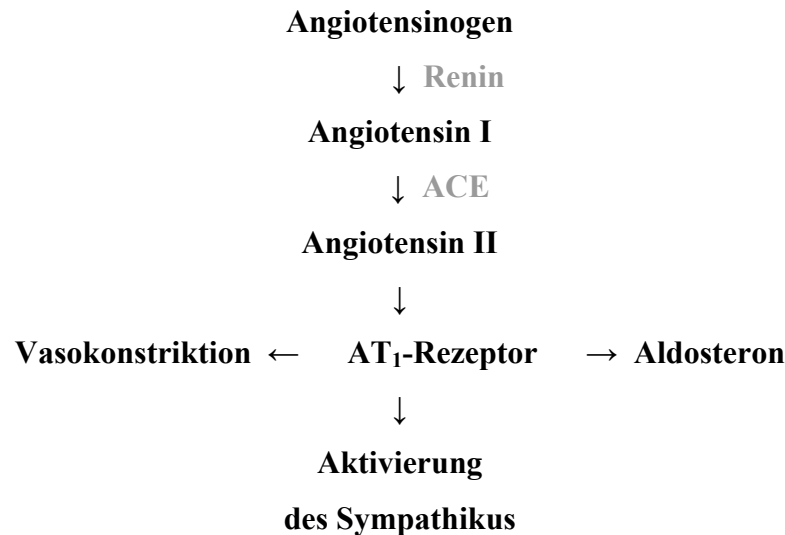


Abb. 1.6 Übersicht über die Signalkaskade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

1.4.2.2 RAAS bei Sepsis

1.4.2.2.1 In vivo - Befunde

Am Tiermodell wurde der Einfluß von Sepsis auf die Aktivität des systemischen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems untersucht.

Hierbei zeigte sich, daß die Plasma Renin-Aktivität und die Plasma Angiotensin II-Konzentration während Sepsis deutlich erhöht waren, während die Plasma Aldosteron-Konzentration unverändert blieb (Bucher et al., 2001).

Es war daher vorstellbar, daß dieses Phänomen, sowie die bereits bekannte verminderte Blutdruckwirksamkeit von Ang II während Sepsis an einer veränderten Angiotensin II Rezeptor Genexpression liegen könnte.

Tatsächlich wurde nach Induktion einer Gram-negativen Sepsis durch Gabe von LPS eine verminderte Expression von AT₁-Rezeptoren in verschiedenen Organen der Ratte gefunden.

Diese verminderte Expression der AT₁-Rezeptoren könnte die verminderte Blutdruck-Antwort auf Ang II während Sepsis bedingen und so für das septische Kreislaufversagen trotz erhöhter Plasma-Konzentrationen von Ang II mitverantwortlich sein.

Um die Bedeutung dieser verminderten Expression von AT₁-Rezeptoren für das septische Kreislaufversagen zu untersuchen, wurden Dosis-Blutdruck-Wirkungsversuche mit Angiotensin II an narkotisierten Ratten durchgeführt. Dabei zeigte sich eine deutlich verminderte blutdrucksteigernde Wirkung von Ang II 12 h nach Injektion von LPS im Vergleich zu vehikel-injizierten Ratten.

1.4.2.2.2 In vitro - Versuche

In Zellkultur-Experimenten an renalen Mesangialzellen der Ratte wurde gezeigt, daß die verminderte Expression von AT₁-Rezeptoren wahrscheinlich durch inflammatorische Zytokine (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ) und durch NO in synergistischer Weise vermittelt wird (Bucher et al., 2001). Diese Befunde sind im Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren an glatten Gefäßmuskelzellen (Cahill et al., 1995; Ichiki et al., 1998; Sasamura et al., 1997).

Die verminderte Expression von AT₁-Rezeptoren während Sepsis könnte über eine Hemmung der Promotor-Aktivität vermittelt werden. So wurde eine verminderte Promotor-Luziferase-Aktivität für den AT_{1a}-Rezeptor durch NO (Ichiki et al., 1998) und Interferon- γ (Ikeda et al., 1999) an glatten Gefäßmuskelzellen beschrieben.

1.5 Fragestellung

Während Sepsis ist die Blutdruckwirksamkeit des vasokonstriktiven Hormons Angiotensin II deutlich reduziert. Der Mechanismus dieser vaskulären Hyporeaktivität auf Angiotensin II ist derzeit nicht schlüssig bekannt.

In vivo und in vitro Untersuchungen haben gezeigt, daß Endotoxin sowie proinflammatorische Zytokine die Expression des AT₁-Rezeptors unterdrücken. Diese Verminderung der AT₁-Rezeptor Expression ist möglicherweise von zentraler Bedeutung für die Pathogenese des Kreislauf- und Organversagens während schwerer Entzündung (septischer Schock).

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Regulation des AT_{1a}-Rezeptors durch Sepsis-typische Mediatoren wie proinflammatorische Zytokine und Stickstoffmonoxid auf zellulärer Ebene an primären glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) der Ratte näher zu charakterisieren, da diesen, aufgrund ihrer Kontraktionsfähigkeit, in der Gefäßwand eine besondere Aufgabe bei der Blutdruck-Regulation zukommt.

Anhand von Dosis-Zeit-Wirkungskurven sollten die optimalen Wirkbedingungen des NO-Donors SNAP sowie der Zytokin-Kombination aus IL-1 β , TNF- α und IFN- γ auf die Hemmung der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression bestimmt werden. Ferner sollte geklärt werden, welche Rolle die einzelnen Zytokine bzw. Kombinationen aus jeweils zwei Zytokinen dabei spielen. Zudem sollte untersucht werden, inwieweit NO, das bei Inkubation der Zellen mit dem Zytokin-Mix aus IL-1 β , TNF- α und IFN- γ durch eine Induktion der NOS II gebildet wird, an der Herabregulation der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression beteiligt ist.

Für proinflammatorische Zytokine ist bekannt, daß sie den Transkriptionsfaktor NF- κ B sowie die drei MAP-Kinase-Kaskaden p42/44 MAPK (extrazelluläre signal-regulierte Kinase, ERK1/2), die SAPK/JNK (c-jun N-terminale) und die p38 MAP-Kinase aktivieren können; daher sollte deren Rolle bei der Herabregulation der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression durch die Kombination der Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ untersucht werden.

Die Expression eines Gens kann prinzipiell auf der transkriptionellen oder aber auch auf der post-transkriptionellen Ebene reguliert werden. Daher sollte in dieser Arbeit weiterhin geklärt werden, ob die durch Zytokine bzw. Stickstoffmonoxid unterdrückte Genexpression des AT_{1a}-Rezeptors auf einer Destabilisierung der mRNA oder auf einer gehemmten Gen-Transkription beruht. Zur Überprüfung einer veränderten transkriptionellen Aktivität des AT_{1a}-Rezeptor Gens wurde ein Reporter Konstrukt mit einem 3,55kb großen Promotor

generiert. Um etwaige regulatorische DNA-Sequenzen des Promotors eingrenzen zu können, wurden zusätzlich Deletions-Konstrukte hergestellt.

Außerdem sollte untersucht werden, ob die durch Zytokine gehemmte Expression des AT_{1a}-Rezeptors die Signalkaskade in der Zelle und damit eine Ca²⁺-Freisetzung aus internen Speichern ins Zytosol beeinträchtigt.

2. MATERIAL und METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Plasmide

Name	Beschreibung	Referenz
pGL3-Basic	<i>firefly</i> Luziferase-Expressionsplasmid ohne Promotor- und Enhancer-Elemente	Promega
pRL-CMV	<i>renilla</i> Luziferase-Expressionsplasmid mit Zytomegalievirus-Promotor	Promega
p3,55kb	pGL3-Basic mit 3,55kb großem Fragment des AT _{1a} -Rezeptor Promotors	diese Arbeit
p1,55kb	wie p3,55kb, jedoch mit einer Deletion von -3545bp bis -1550bp des AT _{1a} -Rezeptor Promotors	diese Arbeit
p0,55kb	wie p3,55kb, jedoch mit einer Deletion von -3545bp bis -550bp des AT _{1a} -Rezeptor Promotors	diese Arbeit
p0,20kb	wie p3,55kb, jedoch mit einer Deletion von -3545bp bis -200bp des AT _{1a} -Rezeptor Promotors	diese Arbeit
p0,075kb	wie p3,55kb, jedoch mit einer Deletion von -3545bp bis -75bp des AT _{1a} -Rezeptor Promotors	diese Arbeit

2.1.2 Oligonukleotide

*siRNA ON-TARGET plus Duplex (Dharmacon)

J-080033-09-0050, rat RelA

Sense: G.C.U.C.A.A.G.A.U.C.U.G.C.C.G.A.G.U.A.U.U

Antisense: 5'- P.U.A.C.U.C.G.G.C.A.G.A.U.C.U.U.G.A.G.C.U.U

J-099587-09-0050, rat NFκBIA

Sense: G.C.C.U.C.A.A.G.A.A.G.G.A.G.C.G.G.U.U.U.U

Antisense: 5'- P.A.A.C.C.G.C.U.C.C.U.U.C.U.U.G.A.G.G.C.U.U

*Primer für die reverse Transkription: Oligo(dT)₁₅ (Promega)

*Primer für die quantitative PCR

Name	Sequenz	Verwendung
sense AT _{1a} -Rezeptor	5' cttaccggccttcggataac'3	PCR mit antisense AT _{1a} -Rezeptor
antisense AT _{1a} -Rezeptor	5' gtgaatggccttggctgt'3	PCR mit sense AT _{1a} -Rezeptor
sense GAPDH	5' acttggcaggtttctcaggcgg'3	PCR mit antisense GAPDH
antisense GAPDH	5' atgcatcactgccactcagaag'3	PCR mit sense GAPDH
sense NOS II	5' gatttttcacgacaccttcacc'3	PCR mit antisense NOS II
antisense NOS II	5' ggtcctctggcctcaactcttgag'3	PCR mit sense NOS II

*Primer für die Generierung des 3,55kb großen AT_{1a}-Rezeptor Promotors

Name	Sequenz	Verwendung
sense rat AT-1A prom 5	5'-cgggtacctcgggattgtgacaagagtgg-3'	PCR mit antisense rat AT-1A prom 1
antisense rat AT-1A prom 1	5'-gaagatcttcccaactgcctggacgtcagc-3'	PCR mit sense rat AT-1A prom 5

*Primer für die Generierung von Mutationen und Deletionen
des 3,55kb großen AT_{1a}-Rezeptor Promotors

Name	Sequenz	Verwendung
sense 1550 KpnI	5'-catgggattgaagaggggtaccacagggctcagggaa-3'	Mutagenese-PCR mit antisense 1550 KpnI
antisense 1550 KpnI	5'-ttccctgagccctgtggtaccctcttcaatcccatg-3'	Mutagenese-PCR mit sense 1550 KpnI
sense 550 KpnI	5'-atctagaattgtcctggtacctttgtgccatttg-3'	Mutagenese-PCR mit antisense 550 KpnI
antisense 550 KpnI	5'-caaaatggcacaaaaggtaccaggacaattctagat-3'	Mutagenese-PCR mit sense 550 KpnI
sense 200 KpnI	5'-ggatctggaaggcgaggtaccgtgactggcagcagg-3'	Mutagenese-PCR mit antisense 200 KpnI
antisense 200 KpnI	5'-cctgctgccagtcacggtacctcgcttccagatcc-3'	Mutagenese-PCR mit sense 200 KpnI
sense 75 KpnI	5'-gcaaagccgagcctgggtaccggaacctgcagagca-3'	Mutagenese-PCR mit antisense 75 KpnI
antisense 75 KpnI	5'-tgctctgcaggtccggtaccaggctcggctttgc-3'	Mutagenese-PCR mit sense 75 KpnI

2.1.3 Internetdienste und Software

Programm	URL
The National Center for Biotechnology Information	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NEBcutter V2.0	http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php
Genomatix MatInspector	http://www.genomatix.de

2.1.4 Medien, Puffer und Lösungen

Zellkultur-Medium für die AVSMC Zellen (Aortic Vascular Smooth Muscle Cells)

Ausgangsmedium: Dulbecco's modified Eagle Medium DMEM (Sigma: D-5796); 500 mL	Zusätze (Sigma): L-Glutamin (G-7513): 2 mM Fetales Kälberserum (F-7524): 10% bzw. 0,1% <u>Antibiotika:</u> 50 U/mL Penicillin 50 µg/mL Streptomycin
--	---

Medien und Agarplatten für *Escherichia coli*

LB-Medium (Luria Broth/Luria <i>et al.</i> , 1960)	1% Bacto-Trypton 0,5% Bacto-Yeast 1% NaCl in H ₂ O _{bidest} lösen, autoklavieren für LB _{Amp} -Medium zusätzlich 100 µg/mL Ampicillin
LB-Agarplatten	1% Bacto-Trypton 0,5% Bacto-Yeast 1% NaCl 2% Bacto-Agar in H ₂ O _{bidest} lösen, autoklavieren + Antibiotikum (100 µg/mL Ampicillin) in Petrischalen mit Deckel (Falcon) gießen
LB-Agarplatten (blau/weiß-Screening)	1% Bacto-Trypton 0,5% Bacto-Yeast 1% NaCl 2% Bacto-Agar in H ₂ O _{bidest} lösen, autoklavieren + Antibiotikum (100 µg/mL Ampicillin) in Petrischalen mit Deckel (Falcon) gießen: vor Gebrauch 30 µL X-Gal auf der Platte verteilen
SOC Medium (Hanahan, 1983)	2% Trypton 0,5% Bacto-Yeast 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 20 mM Glucose 10 mM MgSO ₄ 10 mM MgCl ₂

Puffer für RT und PCR

5x RT Puffer: M-MLV Reverse Transkriptase (Invitrogen)

250 mM Tris/HCl (pH8,3) // 375 mM KCl // 15 mM MgCl₂

10x PCR Puffer (Roche): Proofreading Taq DNA Pol.

100 mM Tris/HCl (pH8,3) // 500 mM KCl // 17,5 mM MgCl₂

10x PCR Puffer (Roche): Taq DNA Pol.

100 mM Tris/HCl (pH8,3) // 500 mM KCl // 15 mM MgCl₂

10x Reaktions-Puffer (STRATAGENE): *PfuTurbo* DNA Pol.

100 mM KCl // 100 mM (NH₄)₂SO₄ // 200 mM Tris-HCl (pH8,8) //
20 mM MgSO₄ // 1% Triton[®] X-100 // 1 mg/mL BSA

Puffer für Restriktionsenzyme (Fermentas)

10x Buffer B

10 mM Tris-HCl (pH 7.5 bei 37°C) // 10 mM MgCl₂ // 0.1 mg/mL BSA

10x Buffer G

10 mM Tris-HCl (pH 7.5 bei 37°C) // 10 mM MgCl₂ // 0.1 mg/mL BSA // 50 mM NaCl

10x Buffer O

10 mM Tris-HCl (pH 7.5 bei 37°C) // 10 mM MgCl₂ // 0.1 mg/mL BSA // 100 mM NaCl

10x Buffer R

10 mM Tris-HCl (pH 8.5 bei 37°C) // 10 mM MgCl₂ // 0.1 mg/mL BSA // 100 mM KCl

10x Buffer Tango[™]

33 mM Tris-acetat (pH 7.9 at 37°C) // 10 mM Magnesium-Acetat //
66 mM Kalium-Acetat // 0.1 mg/mL BSA

Puffer für Ca²⁺-Messung

Ringer: pH 7,4

NaCl	145 mM
KH ₂ PO ₄	0,4 mM
K ₂ HPO ₄	1,6 mM
Glucose	5 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 mM
Ca-Gluconat x 1 H ₂ O	1,3 mM

10x Ligationspuffer: T4 DNA Ligase (NEB)

50 mM Tris/HCl // 10 mM MgCl₂ // 10 mM DTT // 25 µg/mL BSA //
1 mM ATP (Adenosintriphosphat) // pH 7,5

50x TAE Puffer: Tris-Acetat (1 Liter)

242 g Tris in 500 mL H₂O lösen + 100 mL 0,5 M Na₂EDTA (pH 8,0) + 57,1 mL Eisessig
auf 1 L mit H₂O auffüllen

6x Loading Dye

0,09% Bromphenolblau // 0,09% Xylencyanol // 60% Glycerol // 60 mM EDTA
auf 10 mL mit H₂O_{bidest} auffüllen

Ethidiumbromidlösung: Ethidiumbromid 50 mg/mL in H₂O

DNA Molekulargewichtsstandard (Fermentas)

100bp DNA Ladder Plus: Gene Ruler[™]
100bp DNA Ladder: Gene Ruler[™]
1 kb DNA Ladder: Gene Ruler[™]

2.1.5 Enzyme, Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Alexis

DETA NONOate (NOC-18)

Biozym

SafeSeal Tips

Difco

Bacto-Agar, Bacto-Trypton, Bacto-Yeast

dominion Pharmakine

Aortic Vascular Smooth Muscle Cells (DPK-SMAC-R)

Fermentas

DNA Molekulargewichtsstandard

Restriktionsenzyme mit Restriktionspuffer

X-Gal

Invitrogen

Fura-2/AM

M-MLV Reverse Transkriptase; 200 U/ μ L

One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli*

TOPO[®] TA-pCR[®] 2.1 Cloning Kit

Trypsin-EDTA (0.05% Trypsin, with EDTA 4Na) (1X)

Merck

Chloroform

Ethanol

Glycerin

Isopropanol

Natriumacetat

Natriumchlorid

Phenol

MWG-Biotech

Synthese von Oligonukleotiden

Nalgene nunc

Polypropylenzentrifugenröhrchen

New England Biolabs (NEB)

T4 DNA Ligase

Peptrotech

recombinant rat Interferon- γ

recombinant rat Interleukin-1 β

recombinant rat Tumor Necrosis Factor- α

Peqlab

peqGOLD Universal Agarose

Promega

Chemically Competent *E.coli* JM109

Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System

Oligo(dT)₁₅

pGL3-Basic (*firefly* Luziferase-Expressionsplasmid)

pRL-CMV (*renilla* Luziferase-Expressionsplasmid)

Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (DNA Purification System)

Qiagen

DNeasy[®] Tissue Kit (50)

Plasmid Maxi Kit (25)

QuantiTect[™] SYBR[®] Green PCR Kit

RNase-Free DNase Set (50)

RNeasy Mini Kit (250)

Roche

Expand Long Template PCR System

FuGENE[®] 6 Transfection Reagent

Lightcycler Kapillare

Taq DNA Polymerase

Sarstedt

Auslaufpipetten (5mL, 10mL und 25mL)

Multiwell-Platten(6er & 24er)

Pipettenspitzen

Zellkulturflaschen (25cm², 75cm² und 175cm²)

Schott

Glaswaren

Sigma

Ampicillin

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Dulbecco's modified Eagle Medium (D-5796)

Ethidiumbromid

Ethylendiamintetraessigsäure EDTA

Fetales Kälberserum (F-7524)

L-Glutamin (G-7513)

β-Mercaptoethanol

L-Nitrosoaminomethylester (L-NAME)

S-Nitroso-N-Acetyl-DL-Penicillamin (SNAP)

Pyrrolidin-Dithiocarbamat

Stratagene

QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit

2.1.6 Geräte

Analysenwaage	Mettler, H-20T
Autoklav	KSG 112
Elektrophoreseapparatur	Life Technologies Inc., Mod S2 Pharmacia, LKB 2050 MIDGET
Heißluftschüttler	New Brunswick Scientific, Innova 4000
Inkubationsschrank	Heraeus, Modell B6200 IG 150 Jouan
Kühl- und Gefrierschränke	AEG, Santo Kühlschrank Siemens, Comfort plus Gefrierschrank New Brunswick Scientific, Ultra-low-freezer -85°C
Luminometer	EG&G BERTHOLD, Lumat LB 9507
Magnetrührer	Heidolph, MR 3001
Mikroskop	Zeiss, Invertoskop ID 03
PCR-Geräte	MWG, Mod. Omnigene Thermocycler Perkin Elmer, DNA Thermo Cycler 480 Roche, Lightcycler
pH-Meter	Knick, Digital pH-Meter
Photometer	Gene Quant II, Pharmacia
Pipetten	Gilson, Pipetman P10, P20, P100, P1000
Spannungsquellen	Pharmacia, LKB ECPS 3000/150 Pharmacia, LKB GPS 200/400 Pharmacia, Multidrive XL
Sterilbank	Jouan, IC 2.12
UV-Leuchttisch	Renner, Fluorescent Tables
Vortexgerät	Scientific Industries, Vortex Genie 2
Waage	Mettler, P-1210 Feinwaage
Wärmeblock	Eppendorf, Thermostat 5320 Eppendorf, Thermomixer 5436
Wasserbad	Haake, Modell W13
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5417R
Heraeus Varifuge 20RS	Heraeus Megafuge 1.0
Sorvall, Superspeed RC2-B	Sigma, 2 K 15 Kühlzentrifuge

2.2 METHODEN

2.2.1 Kultivierung von Organismen und eukariontischen Zellkulturen

2.2.1.1 Anzucht von *E. coli* Bakterien

Die Kultivierung der *E. coli* Bakterien wurde bei 37°C in LB-Medium durchgeführt. Bei Plasmid tragenden *E. coli* Stämmen wurden zusätzlich 100 µg/mL Ampicillin zugesetzt.

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden 400 µL einer *E. coli* Suspension mit 15% Glycerin versetzt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80°C.

2.2.1.2 Anzucht und Kultivierung der AVSMC Zellen

Die primären glatten Gefäßmuskelzellen aus der Aorta der Ratte (DPK-SMAC-R) wurden von dominion Pharmakine aus Spanien bezogen.

Die Kultivierung der adhärenenten Zellen erfolgte in 75cm² bzw. 175cm² großen Zellkulturflaschen mit Dulbecco's modified Eagle Medium unter Zusatz von 10% bzw. 0,1% FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 U/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂. Das Medium wurde alle 48h gewechselt. Bei 70% bis 90% Konfluenz wurden die Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (0.05% Trypsin, with EDTA 4Na) abgelöst und in 1:5 verdünntem Medium in neue Kulturflaschen ausgesät. Die Versuche wurden ebenfalls bei 70% bis 90% Konfluenz der Zellen gestartet, wobei das Kulturmedium gegen ein neues Kulturmedium mit Zusatz der jeweiligen Testsubstanzen ersetzt wurde.

Dauerkulturen wurden angelegt, indem abgelöste Zellen in Kulturmedium mit 8% DMSO aufgenommen und anschließend langsam (1°C/min) in einer Cryobox auf -80°C abgekühlt wurden. Die Aufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

2.2.2 Gentechnische Methoden

Standardmethoden (Restriktionsverdau von Plasmid-DNA, Auftrennung der DNA durch Gelelektrophorese, T4-DNA-Ligation, Transformation von *E. coli*) wurden wie in Sambrook *et al.* beschrieben durchgeführt. Kompetente *E. coli* wurden von der Firma Promega bezogen.

2.2.2.1 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.2.2.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus einer Ratten-Niere

Die Isolation von genomischer DNA aus einer Ratten-Niere wurde nach Anleitung des QIAGEN DNeasy Tissue Kit Protokolls vorgenommen.

Ein ca. 100 mg schweres Stück aus der gefrorenen Ratten-Niere wurde zum Homogenisieren in kleine Stücke geschnitten und nicht wie üblich mit dem Ultra Turrax behandelt, weil die Gefahr bestand, daß die genomische DNA bricht. Ansonsten wurde laut Protokoll verfahren.

2.2.2.1.2 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Die Gewinnung von Plasmiden aus *E. coli* wurde entweder in kleinem Maßstab (aus 3 mL LB-Kultur, Minipräp) oder im größeren Maßstab (aus 100 mL LB-Kultur, Maxipräp) mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kits nach beiliegendem Protokoll durchgeführt.

2.2.2.1.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration beruht auf dem UV-Absorptionsmaximum von DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm. Von jeder Probe wurde eine 1:20 Verdünnung hergestellt und deren OD bei 260 nm im UV-Spektrometer bestimmt. Unter Einbezug des Verdünnungsfaktors und eines weiteren, für doppelsträngige Nukleinsäuren geltenden Faktors von 50 µg/µL, ergab sich die Probenkonzentration.

2.2.2.1.4 Isolierung von Total RNA aus eukariontischen Zellen

Die RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits. Hierzu wurde dem zum Kit gehörenden Lysispuffer RLT anweisungsgemäß 1% β -Mercaptoethanol als RNase-Inhibitor zugesetzt. Nach dem Absaugen des Mediums wurden in jedes Well (6er-Wellplatte) 350 μ L Lysispuffer gegeben und durch 2-minütiges Schwenken gleichmäßig verteilt. Anschließend folgte eine 5 Minuten dauernde Inkubation bei Raumtemperatur. Das Lysat wurde schließlich mit einem Zellschaber vollständig abgelöst und in Eppendorfgefäße pipettiert. Dort erfolgte durch mehrmaliges Pipettieren eine weitere Verflüssigung der gelartigen Substanz. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C . Zur Ausfällung der DNA wurden zu jeder Probe 350 μ L 70%iges Ethanol gegeben und die ausfallenden Fragmente durch Pipettieren zerkleinert. Das entstehende Gemisch wurde auf eine RNeasy-Säule geladen, diese jeweils 1 Minute bei 11.500 U/min zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Die spezifische Puffer-Zusammensetzung führte hierbei zur selektiven Bindung der RNA an die Säulenmembran. Es folgte die Zugabe von 350 μ L RW1-Puffer, eine 2-3 minütige Inkubationszeit und eine erneute Zentrifugation bei 11.500 U/min für 1 Minute. In diesem Schritt wurden weitere nicht erwünschte Lysefragmente ausgewaschen. Verbliebene DNA-Reste wurden durch die 15-minütige Inkubation mit einer RNase-freien DNase Lösung entfernt. Es folgte eine nochmalige Zugabe von 350 μ L RW1-Puffer und eine erneute Zentrifugation bei 11.500 U/min für 1 Minute. Durch die Zugabe von 500 μ L RPE-Puffer, der zuvor mit Ethanol gemäß Anweisung vervollständigt wurde, und erneuter 1-minütiger Zentrifugation bei 11.500 U/min mußten nun die in den zuvor eingesetzten Lösungen enthaltenen Salze aus der Säule gelöst werden. Eine weitere Zugabe von 500 μ L RPE-Puffer mit anschließender Zentrifugation bei 13.000 U/min für 2 Minuten schloß die Reinigung ab.

Die nun in der Säule verbliebene RNA wurde durch die Zugabe von 30 μ L H_2O und anschließender Zentrifugation bei 11.500 U/min für 1 Minute in ein Eppendorfgefäß eluiert und bei -80°C gelagert.

2.2.2.1.5 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte analog zur DNA-Konzentrationsbestimmung (Kapitel 2.2.2.1.3), jedoch mit einer 1:50 Verdünnung und unter Verwendung des für RNA geltenden Faktors von 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

2.2.2.2 Reverse Transkription und Polymerase Kettenreaktion

2.2.2.2.1 Reverse Transkription

Mittels Reverser Transkription wird die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben, die als Basis für die quantitative PCR dient.

Hierzu wurde je Ansatz das 1 µg RNA enthaltende Volumen in einem 0,5 mL Eppendorfgefäß vorgelegt, mit 1 µL Oligo (dT)₁₅-Nukleotiden (0,5 µg/µL) gemischt und auf 9 µL mit H₂O ergänzt. Dieser Reaktionsansatz wurde für 5 min auf 65°C erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden 4 µL RT Puffer (first strand buffer), 4 µL dNTP (2,5 mM), 3 µL H₂O und 1 µL M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µL) zugegeben. Die reverse Transkription erfolgte bei 37°C für eine Stunde; um das Enzym nach der Reaktion zu denaturieren, wurde der Ansatz für 2 Minuten bei 94°C inkubiert und sogleich auf Eis gestellt. Für die anschließende quantitative PCR wurden je 2 µL der reversen Transkriptions-Reaktion eingesetzt.

2.2.2.2.2 PCR mit dem Expand Long Template PCR System

Die Generierung des 3,55kb großen AT_{1a}-Rezeptor Promotors wurde nach Anleitung des *Expand Long Template PCR Systems* durchgeführt.

Für die PCR wurden 50 ng genomische DNA aus der Rattenniere, 3 µL dNTP (2,5 mM), 5 µL Puffer 1 (10x konz. mit 17,5 mM MgCl₂), 0,5 µL von einem Mix aus Proofreading Polymerase und Taq DNA Polymerase und je 3 µL des 5' und des 3' Primers (je 30 pmol) in einem 50 µL Ansatz eingesetzt. Das Protokoll bestand aus

35 Zyklen mit 30 sec 94°C Denaturierungsphase

30 sec 60°C Annealingsphase

5 min 68°C Elongationsphase.

Vor Beginn des Amplifikations-Protokolls wurde der PCR-Ansatz mit Mineralöl beschichtet und bei 94°C für 5 Minuten inkubiert, um die genomische DNA vollständig zu denaturieren; nach Ablauf der 35 Zyklen wurde der PCR-Ansatz für weitere 10 Minuten bei 68°C inkubiert.

2.2.2.2.3 Quantitative Polymerase Kettenreaktion

Die quantitative Polymerase Kettenreaktion wurde mit dem QuantiTect™ SYBR® Green PCR Master Mix von Qiagen und einem Lightcycler (Roche) durchgeführt.

Alle Proben wurden in einem Reaktionsvolumen von 20 µL mit 10 µL SYBR® Green PCR Master Mix, je 10 pmol sowohl des sense als auch des antisense Primers, 6 µL H₂O und 2 µL cDNA vermessen.

Das Amplifikations-Protokoll bestand aus 40 Zyklen mit einer Denaturierungsphase von 10 Sekunden bei 95°C, einer Annealingsphase von 20 Sekunden bei 58°C und einer Elongationsphase von 15 Sekunden bei 72°C. Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach jedem Zyklus am Ende der Elongationsphase. Nach dem Durchlaufen des Amplifikations-Programms wurde das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA analysiert. Dazu wurde die DNA langsam (0,1°C / Sekunde) von 56°C auf 94°C erhitzt und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen.

2.2.2.2.4 Erstellen von Mutations- und Deletions-Konstrukten durch Mutagenese-PCR

Die Mutagenisierung der Plasmide wurde mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kits der Firma Stratagene durchgeführt. Dabei wurden zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide (s. 2.1.2) so gewählt, daß die Basen der zu mutierenden Sequenz gerichtet ausgetauscht wurden. Für den Reaktionsansatz der Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurden die obigen Oligonukleotide mit der zu mutierenden Plasmid-DNA (p3,55kb) eingesetzt.

50 ng Plasmid-DNA // 10 pmol sense Primer // 10 pmol antisense Primer

3 µL dNTP (2,5 mM) // 2,5 U *PfuTurbo* Taq Pol. // auf 50 µL mit H₂O auffüllen

Thermocycler-Zyklen

18 x 94°C für 30 sec

55°C für 1 min

68°C für 17 min

Der PCR- Ansatz wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym DpnI für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dadurch wird die Template-Plasmid-DNA zerschnitten, während die in der PCR neu synthetisierte mutagenisierte DNA unberührt bleibt. Dies liegt an der Spezifität des Restriktionsenzym, welches nur methylierte DNA schneidet.

Der so behandelte PCR-Ansatz wurde direkt in *E. coli* transformiert, das Plasmid in einer Minipräp (2.2.2.1.2) reisoliert und mittels eines Restriktionsverdaus analysiert.

Für das Entfernen einer Sequenz des 3,55kb großen AT_{1a}-Rezeptor Promotors wurde je nach Art des zu deletierenden Bereiches mit einem gerichteten Basenpaar-Austausch eine SacII-, eine KpnI- bzw. eine BglII-Schnittstelle generiert. Durch einen präparativen Restriktionsverdau mit den jeweiligen Enzymen und einem anschließenden Auftrennen des Restriktionsverdau auf einem 1%-Agarose-Gel wurde die zu deletierende Sequenz vom Rest-Vektor abgetrennt. Der Restvektor wurde aus dem Gel isoliert, religiert und in *E. coli* transformiert, woraus erneut mittels einer Minipräp das Plasmid reisoliert wurde.

2.2.2.3 DNA-Sequenz-Analyse

Die Sequenzierung des 3,55kb großen AT_{1a}-Rezeptor Promotors wurde von der Firma SequiServe in Vaterstetten durchgeführt.

2.2.2.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente bis 300bp wurden auf einem 2%-igen Agarose-Gel, größere DNA-Fragmente wurden auf einem 1%-igen Gel bei 120V aufgetrennt.

2.2.2.5 Elution der DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen

Für die präparative Gelelektrophorese mit anschließender Isolation der DNA aus dem Gel wurden 1%-ige Agarose-Gele verwendet. Die DNA-Fragmente wurden mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten, und die Elution der DNA-Fragmente erfolgte standardmäßig mit dem DNA Purification System von Promega. Die gereinigte DNA wurde in 50 µL H₂O aufgenommen.

2.2.2.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Bei der Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen wurde nach der Methodensammlung von Sambrook *et al.* (1989) verfahren und zusätzlich die Vorschriften der Enzymhersteller (STRATAGENE und Fermentas) berücksichtigt.

2.2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte nach der Vorschrift von Sambrook *et al.* (1989), wobei entweder in 10 µL oder 20 µL Ansätzen für 3 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 14°C ligiert wurde.

2.2.2.8 Klonierung des 3,55kb großen AT_{1a}-Rezeptor Promotors in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor

Die 3,55kb große Sequenz des AT_{1a}-Rezeptor Promotors aus der PCR (2.2.2.2.2) hatte durch die Taq DNA Polymerase an ihren beiden 3'Enden überhängende Adeninbasen. Der pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor ist ein TA-Klonierungs-Vektor, der durch die Topoisomerase I aktiviert ist. Daher wurde für die Ligation folgender Reaktionsansatz verwendet:

- 4 µL AT_{1a}-Rezeptor Promotor
- 1 µL pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor
- 1 µL salt solution

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und zuerst 30 Minuten bei Raumtemperatur, anschließend auf Eis inkubiert. 2 µL vom Ligationsansatz wurden direkt für die Transformations-Reaktion verwendet.

2.2.2.9 Transformation von *E. coli*

Als kompetente Bakterienzellen wurden im Falle des AT_{1a}-Rezeptor Promotors im pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor die im One Shot Kit (Invitrogen) enthaltenen One Shot[®] TOP10 chemisch kompetenten *E. coli* verwendet; ansonsten wurden die chemisch kompetenten *E. coli* JM109 von Promega verwendet.

Die auf Eis aufgetauten 50 µL Zellaliquots wurden mit ca. 100 ng Plasmid-DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 1 Minute wurden die Zellen sofort für 2 Minuten auf Eis gestellt und anschließend 200 µL SOC Medium zugegeben; die Zellen wurden 1 Stunde bei 37°C und 200 rpm geschüttelt und auf vorgewärmte LB-Platten mit Ampicillin (100 µg/mL) ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C.

2.2.2.10 Transfektion der AVSMC-Zellen

Für die Transfektion wurde das FuGENE-System von Roche (Mannheim) verwendet. Am vorhergehenden Tag wurden die Zellen gezählt und in einer Menge von 40.000 Zellen in einem Volumen von 1 mL pro Well in einer 24er-Wellplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurden 7,7 µL serumfreies Nährmedium mit 1,28 µL FuGENE-Reagenz vermischt und für 5 Minuten inkubiert. Nach der Zugabe von 0,6 µg AT_{1a}-Rezeptor-Promotor-Konstrukt (Reporter-Vektor) und 0,03 µg pRL-CMV (Kontroll-Vektor) wurde das Reaktionsgemisch für 25 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung zu Medium und Zellen in die Wells gegeben und vorsichtig verteilt.

16 Stunden später wurde zum vollständigen Entfernen des Transfektions-Reagenz FuGENE das Medium abgenommen und durch neues Medium (0,5 mL) ersetzt. Zwei Stunden später wurde die jeweilige Testsubstanz für 24 Stunden zugegeben.

Nach der Inkubation mit der Testsubstanz wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 100 µL 1x Passiv-Lysepuffer überschichtet, für 25 Minuten bei Raumtemperatur und 260 rpm geschüttelt.

2.2.2.11 Luziferase-Test

Die transfizierten Zellen wurden durch Zugabe von 100 µL 1x Passiv-Lysepuffer unter 25-minütigem Schütteln bei Raumtemperatur lysiert.

Anschließend wurde die Aktivität der *firefly* Luziferase bestimmt, indem 10 µL des Zell-Lysats mit 50 µL Luciferase Assay Reagent II gemischt und für 10 Sekunden im Luminometer (Lumat LB 9501, Berthold) die Lichtemission gemessen wurde. Durch weitere Zugabe von 50 µL Stop & Glo[®] Reagent wurde die Aktivität der *firefly* Luziferase gehemmt und die *renilla* Luziferase aktiviert. Die Lichtemission wurde erneut für 10 Sekunden gemessen. Die relative Luziferase-Aktivität wurde angegeben als das Verhältnis der *firefly* Luziferase Aktivität zur *renilla* Luziferase Aktivität (RLU/RLU).

2.2.3 Fluoreszenzmikroskopische Messung des intrazellulären Kalziums mit Hilfe von Fura-2

Fura-2 wird als Acetomethylester eingesetzt

Für die fluoreszenzmikroskopische Messung des intrazellulären Kalziums wurde die Fura-2 Methode verwendet (Grynkiewicz, 1985).

Fura-2 wurde derivatisiert als zellpermeabler Acetomethylester (AM-Ester) eingesetzt. Aus der schlechten Löslichkeit und der Instabilität von AM-Estern in Wasser ergab sich die Verwendung von DMSO-Stocks. Die 50 µg Aliquots der Fura-2/AM Spezialabpackung von Molecular Probes wurden nach Bedarf in 50 µL DMSO zu einer Stammkonzentration von 1 mM gelöst. Durch die Veresterung mit dem fettlöslichen Acetomethylrest wurde der Farbstoff membranpermeabel. Während der Inkubation diffundierte Fura-2/AM in die Zelle, wo unspezifische Esterasen den AM-Ester hydrolysierten, sodaß der Ca^{2+} -sensitive Indikator freigesetzt wurde. Der polyanionische Charakter des zytosolisch verbleibenden Indikators sorgte dafür, daß der Verlust an Farbstoff durch passiven Leckausstrom über die Zellmembran klein blieb und so die finale intrazelluläre Konzentration des Farbstoffs deutlich höher war als die Konzentration des AM-Esters im Inkubationsmedium.

Fluoreszenzeigenschaften von Fura-2 als Grundlage für Messung

Der Kalziumindikator Fura-2 verändert in Abhängigkeit von der Bindung des Kalziumions sein Exzitationsspektrum. Ungebundenes Fura-2 wird bei einer Wellenlänge von 380 nm angeregt, wohingegen an Kalzium gebundenes Fura-2 bei dieser Wellenlänge nicht detektiert wird. Wenn nun in mit Fura-2 beladenen Zellen die intrazelluläre Kalzium-Menge ansteigt, erhöht sich die Intensität der Emission des an Kalzium gebundenen Fura-2, während die des ungebundenen Fura-2 abnimmt. Über die Bildung des Quotienten (Fluoreszenzratio) der Intensität der Emission (500-530 nm) bei den beiden Anregungswellenlängen (340 nm / 380 nm) können Veränderungen des intrazellulären Kalziums dargestellt werden.

Beladung der Zellen mit Fura-2/AM

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden mit 4 µM Fura-2/AM in Ringer beladen. Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden bei 37°C im Brutschrank.

3. ERGEBNISSE

3.1 Zellkultur - Modell: aortale glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte

Wie bereits erwähnt, sollte der Mechanismus einer veränderten mRNA Expression des AT_{1a}-Rezeptors bei Gabe von Stickstoffmonoxid sowie der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-1 β in vitro an glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) weiterverfolgt werden.

Dazu wurden von dominion pharmakine primäre AVSMC-Zellen bezogen, welche einer einzelnen Ratten-Aorta entstammen (Bestell-Nr.: DPK-SMAC-R).

Morphologische und immuno-zytochemische Charakterisierung gewährleiten dabei eine hohe Reinheit der isolierten aortalen glatten Gefäßmuskelzellen.

Um festzustellen, ob die gewählten AVSMC-Zellen als Zellkultur-Modell geeignet sind, mußte geklärt werden, ob das Gen des AT_{1a}-Rezeptors tatsächlich exprimiert wird.

Dazu wurde Gesamt-RNA aus den AVSMC-Zellen isoliert und eine Reverse Transkription der RNA in cDNA durchgeführt. Mit spezifischen Primern wurde eine PCR an der Gesamt-cDNA durchgeführt, um cDNA, welche den AT_{1a}-Rezeptor codiert, zu amplifizieren; das dabei gebildete PCR-Produkt muß eine Größe von ca. 155 bp aufweisen.

Anschließend wurde der PCR-Reaktions-Ansatz zusammen mit einem DNA-Größen-Standard auf ein Ethidiumbromid-gefärbtes 2%-Agarose-Gel aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte bei 120 V.

Wie in der unteren Abbildung zu sehen ist, wurde in der PCR ein spezifisches PCR-Produkt gebildet, dessen Größe bei ca. 155 bp liegt.

Das läßt darauf schließen, daß die AVSMC-Zellen den AT_{1a}-Rezeptor exprimieren.

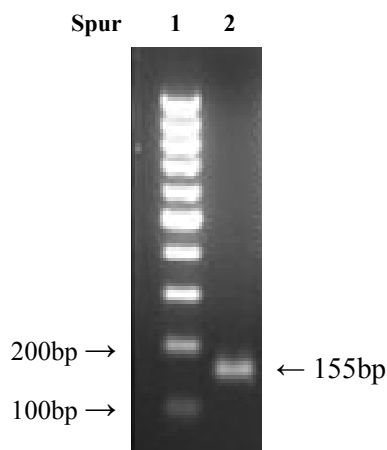


Abb. 3.1 Ethidiumbromid-gefärbtes 2%-Agarose-Gel

1. Spur Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus Fermentas
2. Spur PCR-Produkt des AT_{1a}-Rezeptors

3.2 mRNA - Daten

3.2.1 Einfluß des Zytokin-Mix aus IFN- γ , IL-1 β und TNF- α

3.2.1.1 mRNA Expression des AT_{1a}-Rezeptors und der NOS II bei einem 24h-Zeitgang

Ziel dieses Versuchs war es, die Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA in Abhängigkeit von der Zeit zu klären. Außerdem wurde die Expression der NOS II mRNA betrachtet, um die Aktivität der Zytokine und damit die Effektivität des experimentellen Protokolls zur Induktion einer Sepsis zu gewährleisten.

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden mit dem Mix aus den drei Zytokinen IFN- γ , IL-1 β und TNF- α inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten (s. untere Abb.) geerntet.

Die Expression der NOS II mRNA (Abb. 3.2-B) war bereits nach 4h deutlich gesteigert und erreichte ihr Maximum bei 12h; die Induktion der NOS II mRNA (s. 12h-Wert) änderte sich im Verlauf von weiteren 12h (s. 24h-Wert) nur noch geringfügig. Damit konnte auch gezeigt werden, daß die Zytokine eine Wirkung auf die glatten Gefäßmuskelzellen haben.

Der Verlauf der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression (Abb. 3.2-A) war biphasisch. In den ersten 8h wurde die Expression des Rezeptors deutlich gesteigert, die sich danach aber umkehrte: nach 12h sieht man bereits eine verminderte Expression, die bei 24h am stärksten ausgeprägt ist.

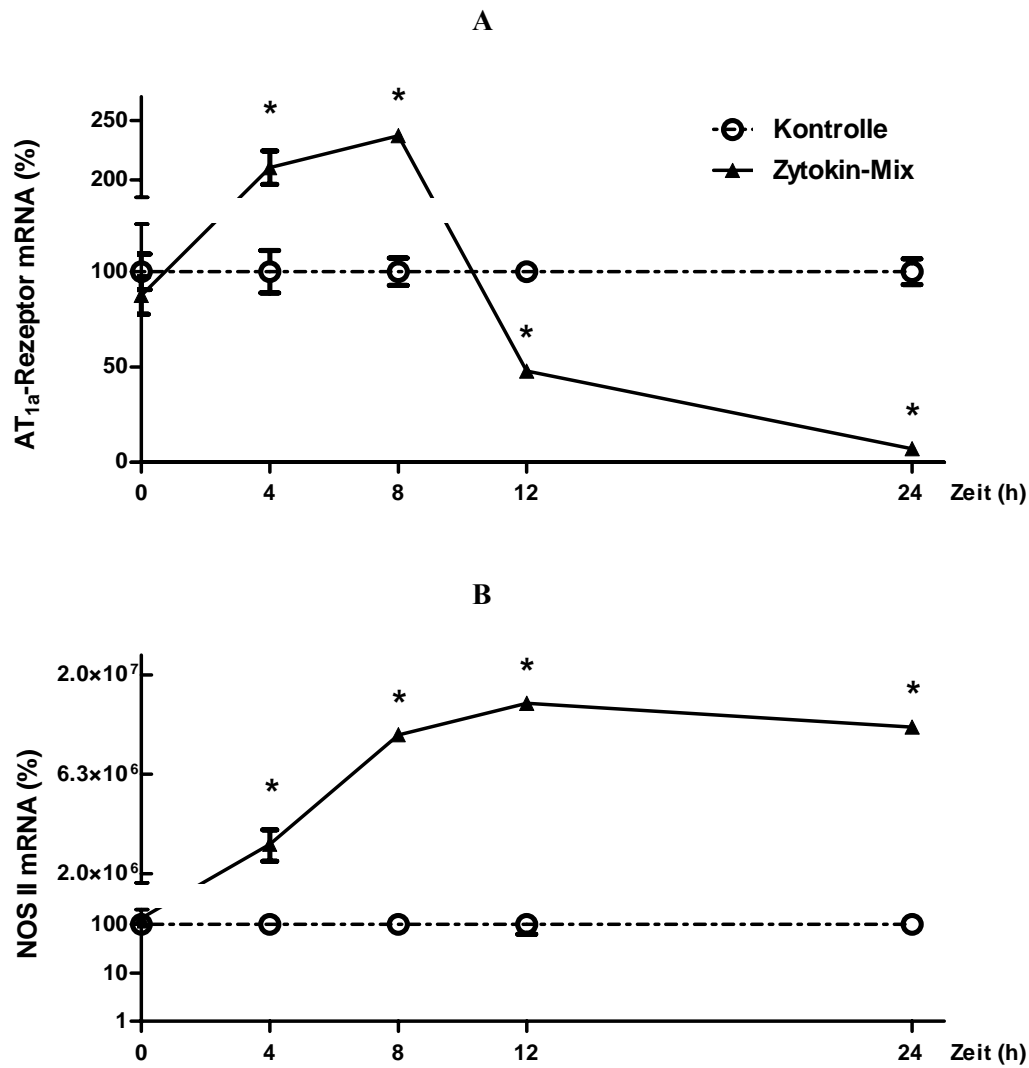


Abb. 3.2 Zeit-abhängiger Effekt des 3er-Zytokin-Mix auf die Expression der AT_{1a}-Rezeptor (A) und der NOS II (B) mRNA

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden mit dem Zytokin-Mix aus IFN- γ à 100 ng/mL, IL-1 β à 50 ng/mL und TNF- α à 100 ng/mL inkubiert. 0h, 4h, 8h, 12h und 24h nach Applikation des Zytokin-Mix wurde die Abundanz der AT_{1a}-Rezeptor (A) und der NOS II (B) mRNA mittels Real Time RT-PCR bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 3 Proben pro Gruppe. * p < 0,05 vs. Kontrolle.

3.2.1.2 mRNA Expression des AT_{1a}-Rezeptors und der NOS II bei einem 72h-Zeitgang

Der Zytokin-Mix aus IFN- γ , IL-1 β und TNF- α führte in den Zellen nach 24h zu einer stark verminderten Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA auf ca. 8,5%.

In einem weiterführenden Versuch sollte geklärt werden, ob diese Herabregulation tatsächlich durch eine über die Zytokine vermittelte Signalkaskade zustandekam, oder ob diese unterdrückte Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA unspezifisch - etwa ein apoptotischer Effekt - war.

Im Falle einer spezifischen Regulation sollte der Effekt der Zytokine bei Entfernung aus dem Medium reversibel sein.

Die Zellen wurden für 24h mit dem Mix inkubiert und anschließend mit frischem Medium ohne Zytokin-Zusatz für weitere 24h bzw. 48h inkubiert.

Wie man in der Abbildung 3.3-A sehen kann, wurde bei Gabe des Zytokin-Mix für 24h die AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression auf ca. 8% gehemmt. Bei Entzug des Zytokin-Mix aus dem Medium ging diese starke Hemmung der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression weitere 24h später zum Teil zurück (s. 48h-Wert) und wurde 48h später (s. 72h-Wert) komplett aufgehoben.

Auch die starke Induktion der NOS II mRNA Expression auf das 10⁵-fache (s. 24h-Wert) durch den Zytokin-Mix (Abb. 3.3-B) wurde bei Entnahme der Zytokine aus dem Medium fast komplett aufgehoben (s. 72h-Wert).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Hemmung der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression durch eine regulierte Signalkaskade zustandekommt und nicht etwa durch eine Zytokin-induzierte Apoptose der Zellen.

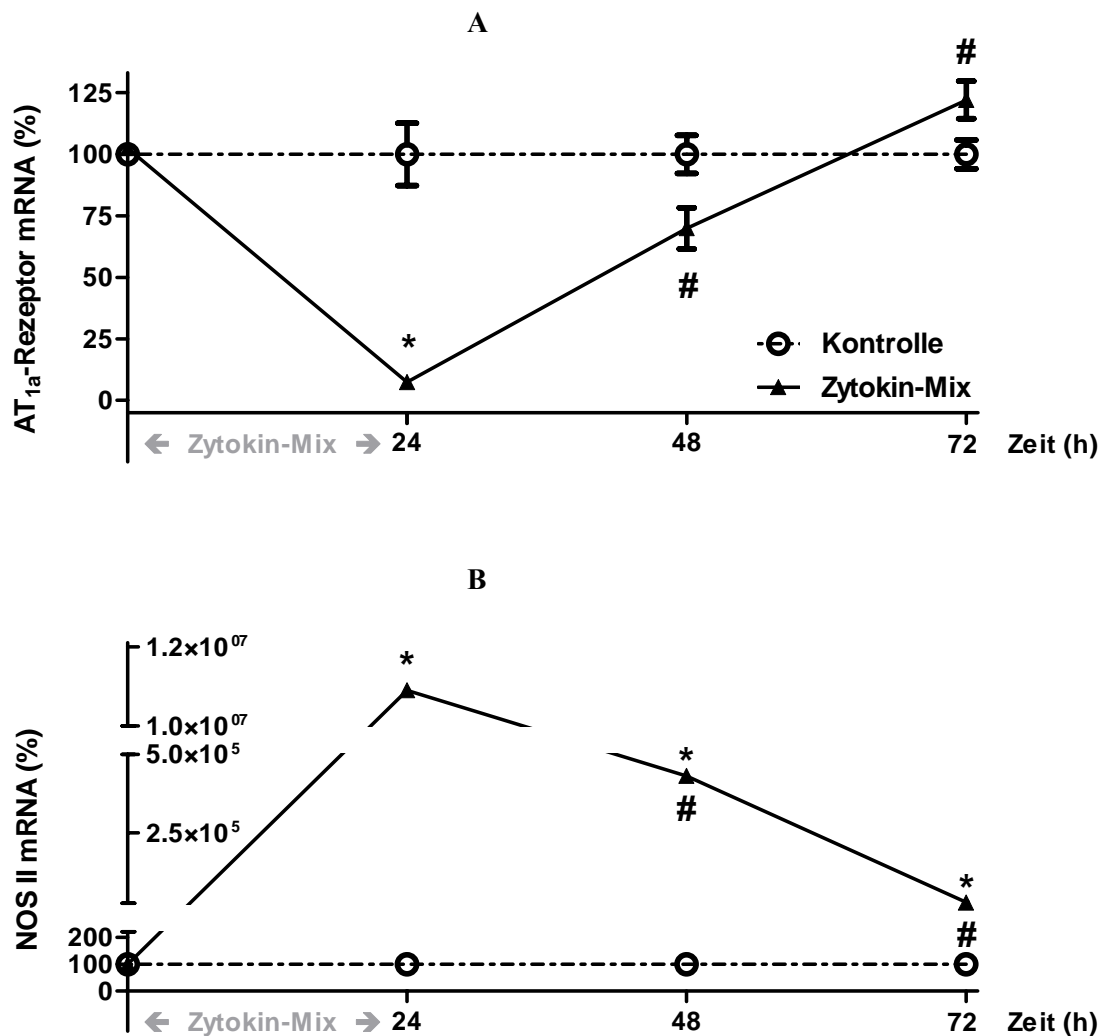


Abb. 3.3 Zeit-abhängiger Effekt des Zytokin-Mix aus IFN- γ , IL-1 β und TNF- α auf die mRNA Expression des AT_{1a}-Rezeptors und der NOS II

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden für 24h mit dem Zytokin-Mix aus IFN- γ à 100 ng/mL, IL-1 β à 50 ng/mL und TNF- α à 100 ng/mL inkubiert. Anschließend wurde das Medium der Zytokin-behandelten Zellen erneuert, diesmal ohne Zusatz des Zytokin-Mix. Weitere 24h bzw. 48h später wurden die Zellen geerntet. Die Abundanz der AT_{1a}-Rezeptor (A) bzw. der NOS II (B) mRNA wurde mittels Real Time RT-PCR bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 3 Proben pro Gruppe.

* p < 0,05 vs. Kontrolle. # p < 0,05 vs. 24h.

3.2.1.3 Konzentrations-abhängige mRNA Expression des AT_{1a}-Rezeptors und der NOS II

Um die Konzentrations-Abhängigkeit der Wirkung des Zytokin-Mix aus IFN- γ (100 ng/mL), IL-1 β (50 ng/mL) und TNF- α (100 ng/mL) (\triangleq 100% der Zytokin-Dosis) auf die mRNA Abundanz des AT_{1a}-Rezeptors und der NOS II zu ermitteln, wurden die Zellen für 24h mit verschiedenen Verdünnungen dieses Zytokin-Mix inkubiert.

Es ergab sich eine deutliche Konzentrations-Abhängigkeit, wobei die halb-maximale Hemmwirkung (IC₅₀) auf die mRNA Expression des AT_{1a}-Rezeptors bei ca. 1% der oben genannten Dosis lag (Abb. 3.4-A: 1% \triangleq 1 ng/mL IFN- γ , 0,5 ng/mL IL-1 β und 1 ng/mL TNF- α). Wie man sehen kann, wurde auch die NOS II mRNA Expression abhängig von der Konzentration des Zytokin-Mix induziert.

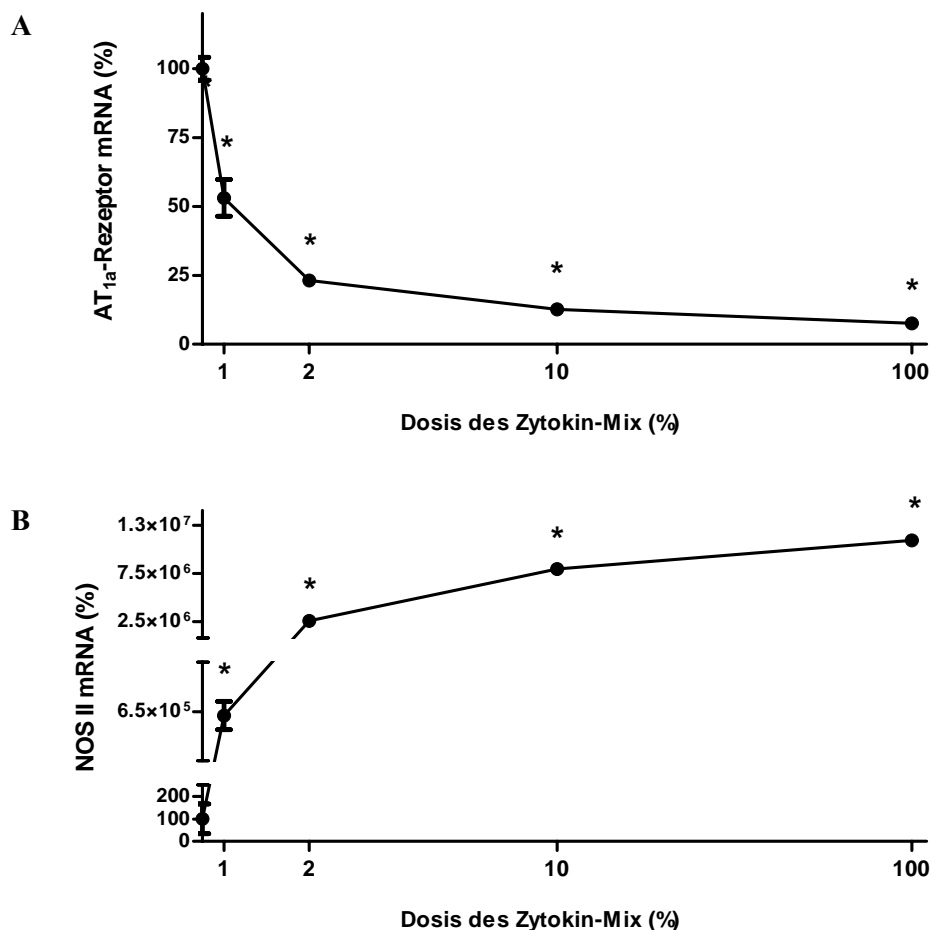


Abb. 3.4 Konzentrations-abhängiger Effekt des Zytokin-Mix auf die mRNA Expression des AT_{1a}-Rezeptors und der NOS II

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden für 24h mit 1%, 2%, 10% bzw. 100% des Zytokin-Mix aus IFN- γ à 100 ng/mL, IL-1 β à 50 ng/mL und TNF- α à 100 ng/mL inkubiert. Die Abundanz der AT_{1a}-Rezeptor (A) und der NOS II (B) mRNA wurde mittels Real Time RT-PCR bestimmt.

Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 3 Proben pro Gruppe. * p < 0,05 vs. Kontrolle.

3.2.2 Einfluß der Zytokine einzeln bzw. in Kombination

- mRNA Expression des AT_{1a}-Rezeptors und der NOS II nach 24h -

In den glatten Gefäßmuskelzellen wurde der Einfluß der einzelnen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IFN- γ sowie die Wirkung der Kombinationen aus jeweils zwei dieser Zytokine auf die Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA (Abb. 3.5-B) und der NOS II mRNA (Abb. 3.5-A) im Vergleich zur Wirkung der Kombination aus allen drei Zytokinen untersucht.

Wie in der Abbildung 3.5-A zu sehen ist, wurde die Expression der NOS II mRNA durch die Zytokine, sowohl einzeln als auch im Mix, deutlich gesteigert.

Die Abbildung 3.5-B zeigt, daß die Zytokine IFN- γ und TNF- α jeweils zu einer Herabregulation der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression führten; beide Zytokine verminderten die Expression der Rezeptor-mRNA auf ca. 50%.

IL-1 β hatte im Gegensatz zu den Zytokinen IFN- γ und TNF- α keinen Einfluß auf die AT_{1a}-Rezeptor Genexpression.

Die Kombinationen aus je zwei Zytokinen

- IL-1 β + TNF- α ,
- IL-1 β + IFN- γ bzw.
- IFN- γ + TNF- α

führten jeweils zu einer Unterdrückung der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression auf ca. 70%, 20% bzw. 15%.

Der Mix aus den drei Zytokinen IL-1 β + TNF- α + IFN- γ zeigte den größten Effekt: die Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA wurde bis auf ca. 8,5% herabreguliert.

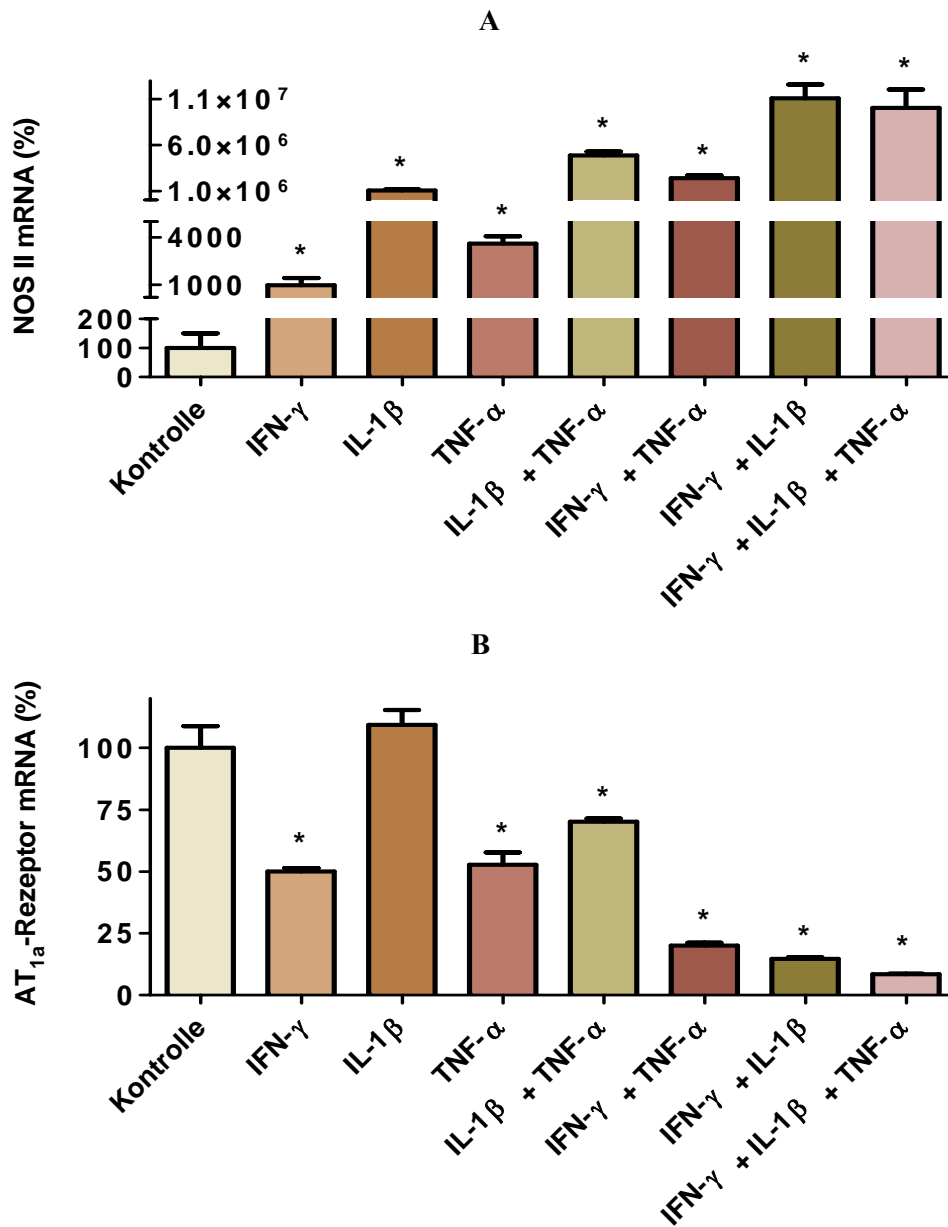


Abb. 3.5 Einfluss der Zytokine IFN- γ , IL-1 β und TNF- α auf die Expression der AT_{1a}-Rezeptor (B) und der NOS II (A) mRNA

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden für 24h mit den Zytokinen IFN- γ à 100 ng/mL, IL-1 β à 50 ng/mL und TNF- α à 100 ng/mL einzeln bzw. in Kombination inkubiert. Die Abundanz der AT_{1a}-Rezeptor mRNA (B) und der NOS II mRNA (A) wurde mittels Real Time RT-PCR bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 3 Proben pro Gruppe. * p < 0,05 vs. Kontrolle.

3.2.3 Rolle von Stickstoffmonoxid

Der Zytokin-Mix aus IFN- γ (100 ng/mL), IL-1 β (50 ng/mL) und TNF- α (100 ng/mL) führte nach 24h zu einer Hemmung der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression auf ca. 8%. Gleichzeitig stieg die Expression der NOS II mRNA um einen Faktor von ungefähr 10⁵ an.

Um zu überprüfen, ob Stickstoffmonoxid allein bzw. endogen gebildetes NO bei Zytokin-Gabe eine Rolle bei der verminderten mRNA Expression des AT_{1a}-Rezeptors spielt, wurden die Zellen

1. mit dem NO-Donor SNAP (S-Nitroso-N-Acetyl-DL-Penicillamin)
2. mit dem Zytokin-Mix + L-NAME (Inhibitor der endogenen NO-Bildung)

inkubiert.

3.2.3.1 Einfluß von SNAP

3.2.3.1.1 mRNA Expression des AT_{1a}-Rezeptors bei einem 24h-Zeitgang

Die Gefäßmuskelzellen wurden über einen Zeitraum von 24h mit dem NO-Donor SNAP inkubiert (Abb. 3.6), um zu klären, ob Stickstoffmonoxid einen Effekt auf die Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA hat.

Die untere Abbildung zeigt, daß es in Abhängigkeit von der Zeit zu einer Herabregulation der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression kam, die bei 24h am stärksten ausgeprägt war.

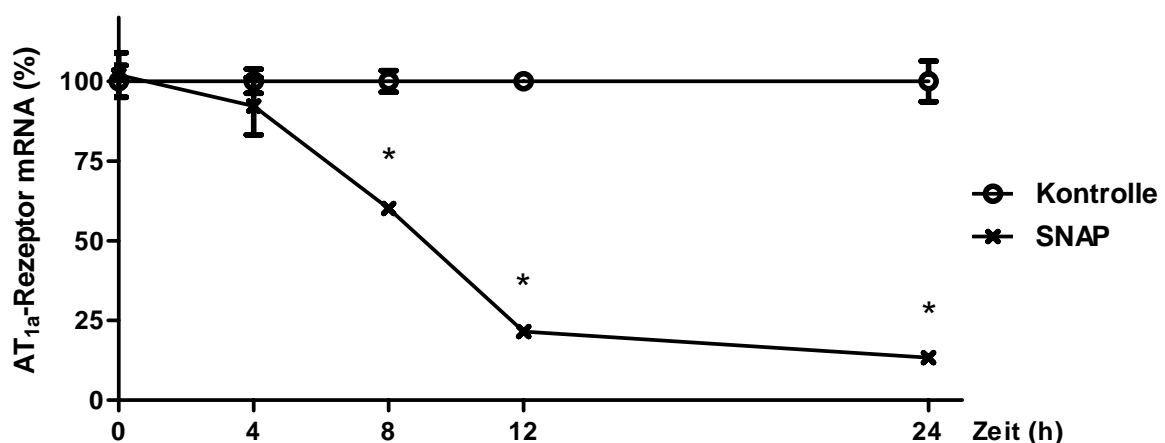


Abb. 3.6 Zeit-abhängiger Effekt von SNAP auf die Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden mit dem NO-Donor SNAP (0,2 μ M) inkubiert. 0h, 4h, 8h, 12h und 24h nach Applikation von SNAP wurde die Abundanz der AT_{1a}-Rezeptor mRNA mittels Real Time RT-PCR bestimmt.

Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 3 Proben pro Gruppe. * p < 0,05 vs. Kontrolle.

3.2.3.1.2 Konzentrations-abhängige mRNA Expression des AT_{1a}-Rezeptors

Neben einem Zeitgang mit SNAP wurde zusätzlich eine Konzentrationsreihe durchgeführt, um eine Dosis-Wirkung des NO-Donors auf die mRNA Abundanz des AT_{1a}-Rezeptors zu ermitteln.

Dazu wurden die glatten Gefäßmuskelzellen 12h mit SNAP in den Konzentrationen 0,02 mM, 0,1 mM, 0,2 mM, 1,0 mM und 2,0 mM inkubiert.

Es ergab sich eine deutliche Konzentrations-Abhängigkeit, wobei die halb-maximale Hemmwirkung (IC₅₀) des NO-Donors auf die mRNA Expression des AT_{1a}-Rezeptors bei ca. 0,1 mM lag (Abb. 3.7).

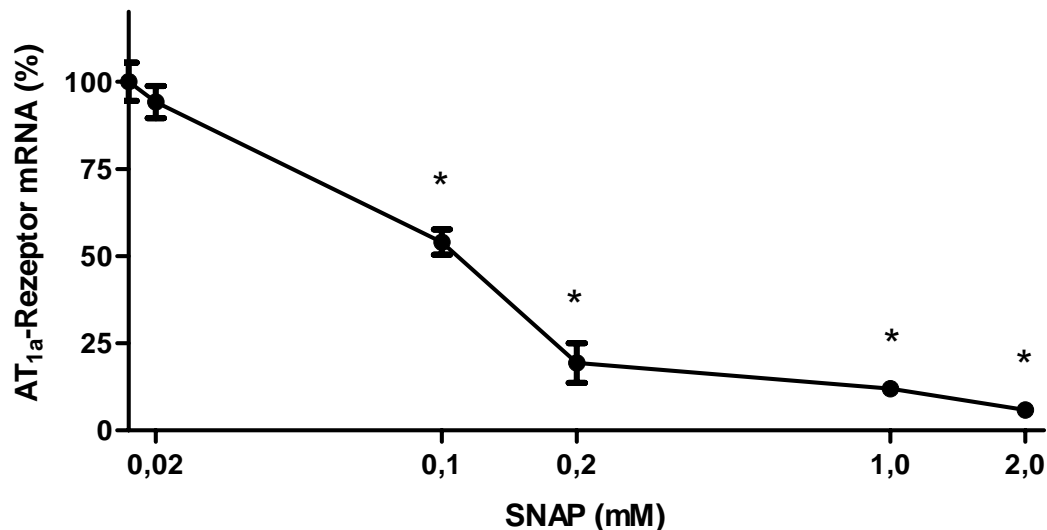


Abb. 3.7 Konzentrations-abhängiger Effekt des NO-Donors SNAP auf die Expression des AT_{1a}-Rezeptors

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden für 12h mit 0,02 / 0,1 / 0,2 / 1,0 bzw. 2,0 mM SNAP inkubiert. Die Abundanz der AT_{1a}-Rezeptor mRNA wurde mittels Real Time RT-PCR bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 3 Proben pro Gruppe. * p < 0,05 vs. Kontrolle.

Nachdem NO offensichtlich selbst eine hemmende Wirkung auf die Expression des AT_{1a}-Rezeptors ausübte, sollte nun geklärt werden, welche Rolle endogen gebildetes Stickstoffmonoxid bei der Regulation der AT_{1a}-Rezeptor mRNA durch Zytokine spielt.

Dazu wurden die Gefäßmuskelzellen mit dem Zytokin-Mix aus IFN- γ (100 ng/mL), IL-1 β (50 ng/mL) und TNF- α (100 ng/mL) in Kombination mit L-NAME, einem Inhibitor der endogenen NO-Bildung durch die NOS II, inkubiert.

3.2.3.2 Einfluß von L-NAME

Es sollte geklärt werden, welche Rolle NO bei der verminderten Expression der AT_{1a} -Rezeptor mRNA bei Gabe des Zytokin-Mix aus $IFN-\gamma$, $IL-1\beta$ und $TNF-\alpha$ spielt.

Dazu wurden die Gefäßmuskelzellen für 24h mit dem Zytokin-Mix in Kombination mit L-NAME in den Konzentrationen von 1 mM bzw. 5 mM inkubiert.

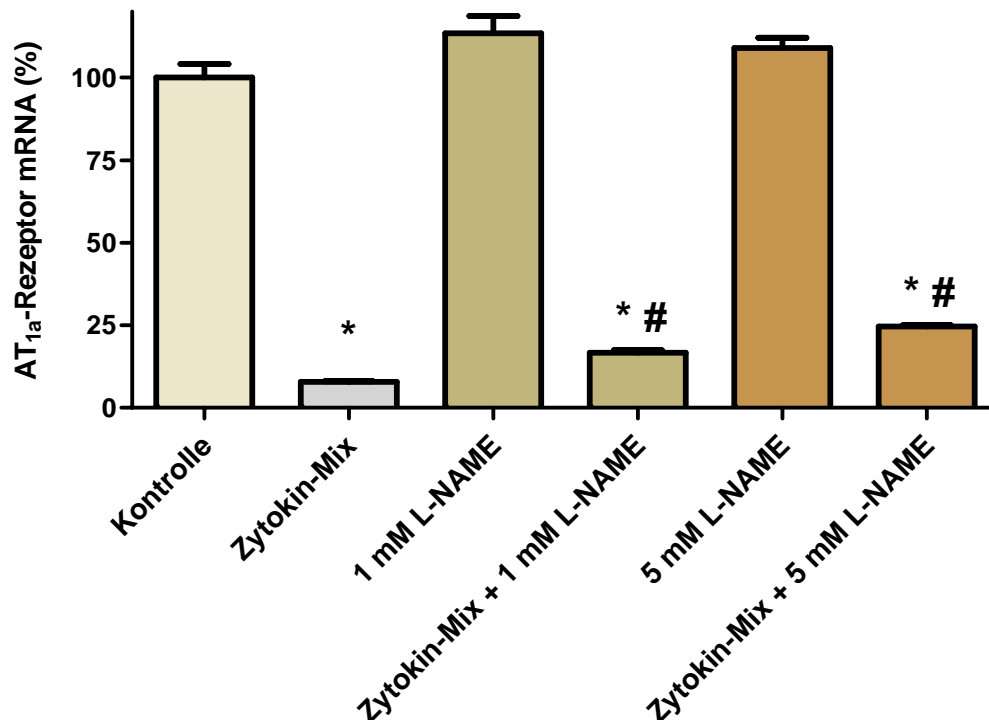


Abb. 3.8 Effekt des Zytokin-Mix zusammen mit L-NAME auf die mRNA Expression des AT_{1a} -Rezeptors

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden für 24h mit dem Zytokin-Mix aus $IFN-\gamma$ à 100 ng/mL, $IL-1\beta$ à 50 ng/mL und $TNF-\alpha$ à 100 ng/mL in Kombination mit 1 mM bzw. 5 mM L-NAME inkubiert. Die Abundanz der AT_{1a} -Rezeptor mRNA wurde mittels Real Time RT-PCR bestimmt.

Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 3 Proben pro Gruppe.

* p < 0,05 vs. Kontrolle. # p < 0,05 vs. Zytokin-Mix.

Wie man in der Abbildung 3.8 sieht, wurde die mRNA Expression des AT_{1a} -Rezeptors durch den Zytokin-Mix auf ca. 8% herabreguliert.

Eine Inkubation der Zellen mit dem Zytokin-Mix in Kombination mit 1 mM L-NAME bzw. 5 mM L-NAME unterdrückte die Expression der AT_{1a} -Rezeptor mRNA auf ca. 17% bzw. 25%.

3.2.4 Bedeutung der MAP-Kinase-Signaltransduktionswege

MAP-Kinasen regulieren die verschiedensten zellulären Prozesse wie Embryogenese, Zelldifferenzierung, Homöostase und zelluläre Antworten.

Derzeit sind 3 verschiedene MAP-Kinase-Kaskaden in Säugetierzellen ausführlich beschrieben und untersucht worden: der durch die p42/44 (extrazelluläre signalregulierte Kinase, ERK1/2) vermittelte, der durch die SAPK/JNK (c-jun N-terminale) vermittelte und der p38-MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg.

Die Kinase-Kaskaden werden alle durch extrazelluläre Signale aktiviert, wobei u.a. LPS und proinflammatorische Zytokine zu den effektivsten Stimuli gehören.

Es sollte geklärt werden, ob diese drei MAP-Kinase-Kaskaden an der Herabregulation der AT_{1a}-Rezeptor mRNA bei Gabe des Zytokin-Mix aus IFN- γ , IL-1 β und TNF- α beteiligt sind, indem die Gefäßmuskelzellen mit dem Zytokin-Mix in Kombination mit gängigen MAP-Kinase-Inhibitoren inkubiert wurden (Abb. 3.9).

Die Aktivierung der p42/44 MAPK wurde durch den Einsatz von PD98059 (30 μ M), die der SAPK/JNK durch SP600125 (30 μ M) und die der p38-MAPK durch SB203580 (30 μ M) gehemmt.

Der Zytokin-Mix allein unterdrückte die Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA auf ca. 8%. In Kombination mit PD98059, SP600125 bzw. SB203580 führte der Zytokin-Mix zu einer Herabregulation der AT_{1a}-Rezeptor mRNA auf ca. 11%, 7% bzw. 8%.

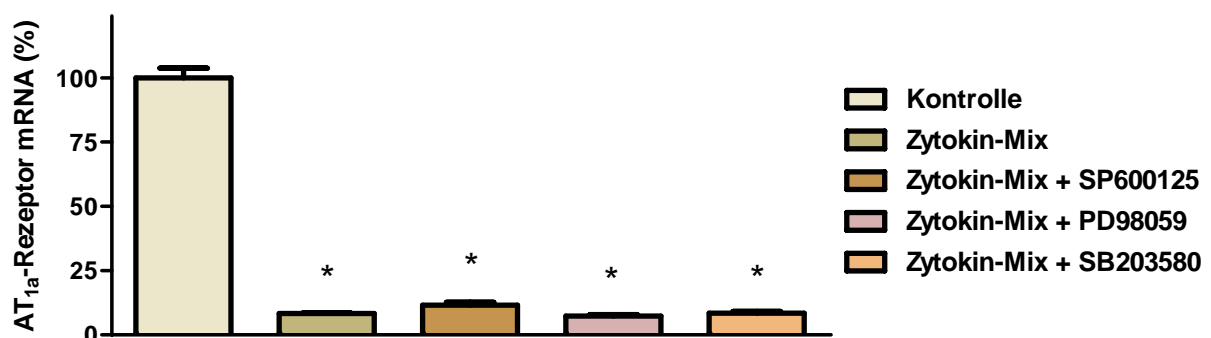


Abb. 3.9 Einfluss von MAPK-Inhibitoren auf die durch den Zytokin-Mix verminderte Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden für 1h mit den MAPK-Hemmern SP600125, PD98059 und SB203580 à 30 μ M vorinkubiert. Dann wurde jeweils der Zytokin-Mix aus IFN- γ à 100 ng/mL, IL-1 β à 50 ng/mL und TNF- α à 100 ng/mL für 24h zugegeben.

Die Abundanz der AT_{1a}-Rezeptor mRNA wurde mittels Real Time RT-PCR bestimmt.

Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 3 Proben pro Gruppe. * p < 0,05 vs. Kontrolle.

3.2.5 Rolle des Transkriptionsfaktors NF-κB

Wie bereits erwähnt wurde, spielt NF-κB eine wesentliche Rolle bei Entzündungs-Prozessen. Dieser Transkriptionsfaktor aktiviert die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, die wiederum NF-κB aktivieren.

Im folgenden Versuchs-Ansatz sollte überprüft werden, ob dieser Transkriptionsfaktor auch für die Hemmung der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression verantwortlich ist.

Um eine Beteiligung des NF-κB zu untersuchen, wurde parallel zur Zytokin-Mix-Gabe der nicht-selektive NF-κB-Inhibitor PDTC (Pyrrolidin-Dithiocarbamat) eingesetzt.

Die NOS II mRNA Expression (Abb. 3.10) diene als Positiv-Kontrolle, da bekanntermaßen NF-κB diese Stickstoffmonoxid-Synthase induziert.

Wie in der unteren Abbildung zu sehen ist, inhibierte 0,5 mM PDTC die NOS II mRNA Expression auf ca. 65%, und bei einer Konzentration von 1,0 mM wurde die Expression der NOS II mRNA durch PDTC signifikant auf ungefähr 35% gesenkt.

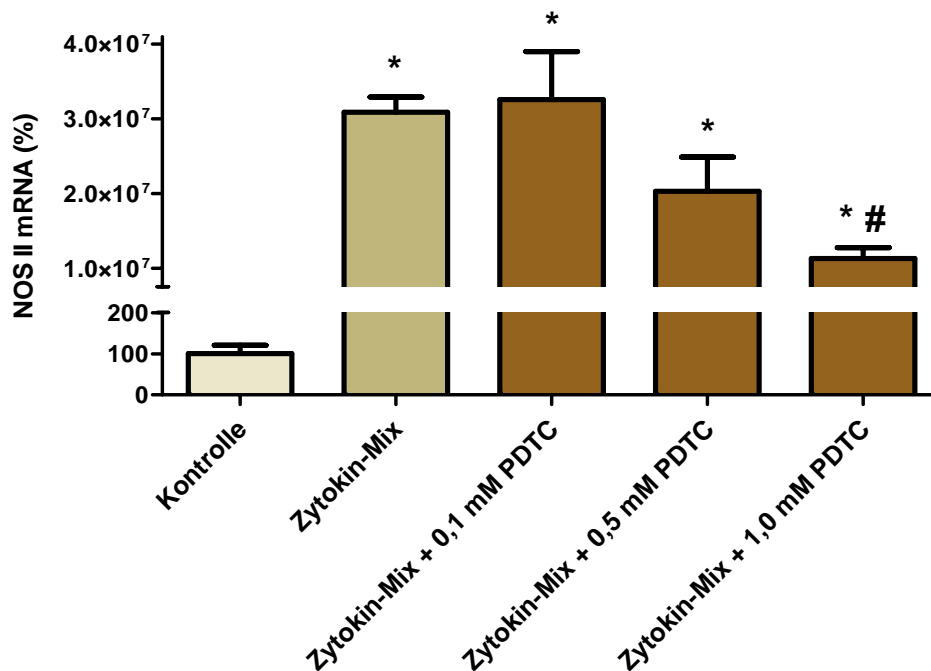


Abb. 3.10 Effekt des Zytokin-Mix zusammen mit PDTC auf die Expression der NOS II mRNA

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden für 1h mit dem nicht-selektiven NF-κB-Inhibitor PDTC in den Konzentrationen 0,1 mM, 0,5 mM bzw. 1,0 mM präinkubiert. Dann wurde der Zytokin-Mix aus IFN-γ à 100 ng/mL, IL-1β à 50 ng/mL und TNF-α à 100 ng/mL für weitere 24h zugegeben.

Die Abundanz der NOS II mRNA wurde mittels Real Time RT-PCR bestimmt.

Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM von n = 3 Proben pro Gruppe.

* p < 0,05 vs. Kontrolle. # p < 0,05 vs. Zytokin-Mix.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß der nicht-selektive NF- κ B-Inhibitor einen hemmenden Effekt auf die Expression der NOS II mRNA hatte, wurde die Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA überprüft (Abb. 3.11).

Wie in der unteren Abbildung zu sehen ist, führte der Zytokin-Mix allein zu einer Herabregulation der AT_{1a}-Rezeptor mRNA auf ca. 11%.

Wurden die glatten Gefäßmuskelzellen mit dem Zytokin-Mix in Kombination mit PDTC in den Konzentrationen 0,1 mM, 0,5 mM bzw. 1,0 mM behandelt, wurde die Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA auf ca. 12%, 9% bzw. 7,5% gehemmt.

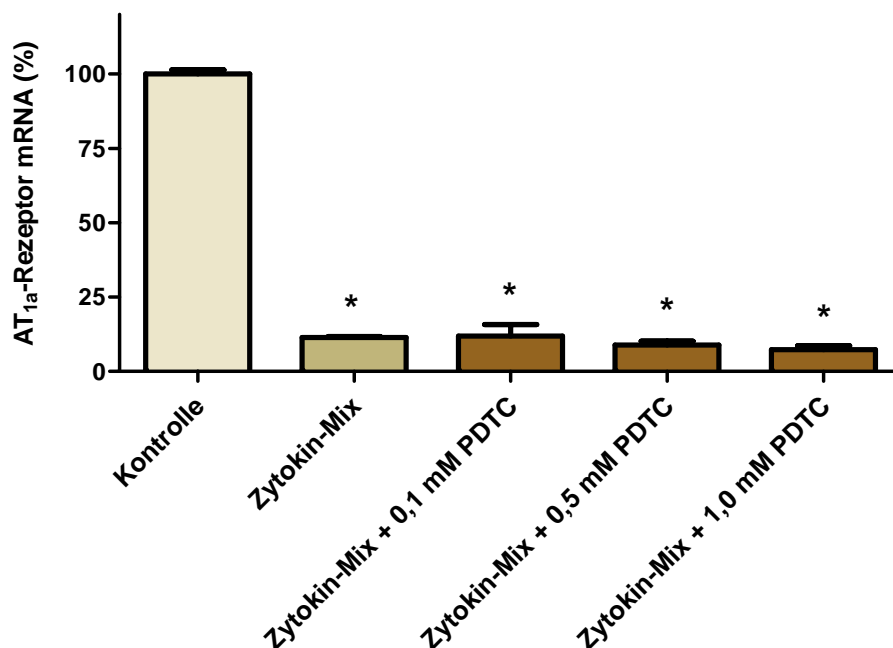


Abb. 3.11 Effekt des Zytokin-Mix zusammen mit PDTC auf die Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden für 1h mit dem nicht-selektiven NF- κ B-Inhibitor PDTC in den Konzentrationen 0,1 mM, 0,5 mM bzw. 1,0 mM präinkubiert. Dann wurde der Zytokin-Mix aus IFN- γ à 100 ng/mL, IL-1 β à 50 ng/mL und TNF- α à 100 ng/mL für weitere 24h zugegeben. Die Abundanz der AT_{1a}-Rezeptor mRNA wurde mittels Real Time RT-PCR bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 3 Proben pro Gruppe. * p < 0,05 vs. Kontrolle.

3.2.6 Stabilität der AT_{1a}-Rezeptor mRNA

Die verminderte Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA bei Gabe des Zytokin-Mix (IFN- γ , IL-1 β und TNF- α) bzw. des NO-Donors SNAP könnte auf eine Destabilisierung der Rezeptor mRNA zurückzuführen sein.

Um zu überprüfen, ob der Zytokin-Mix bzw. SNAP zu einer veränderten mRNA-Stabilität führen, wurde die Halbwertszeit der AT_{1a}-Rezeptor mRNA gemessen (Abb. 3.12).

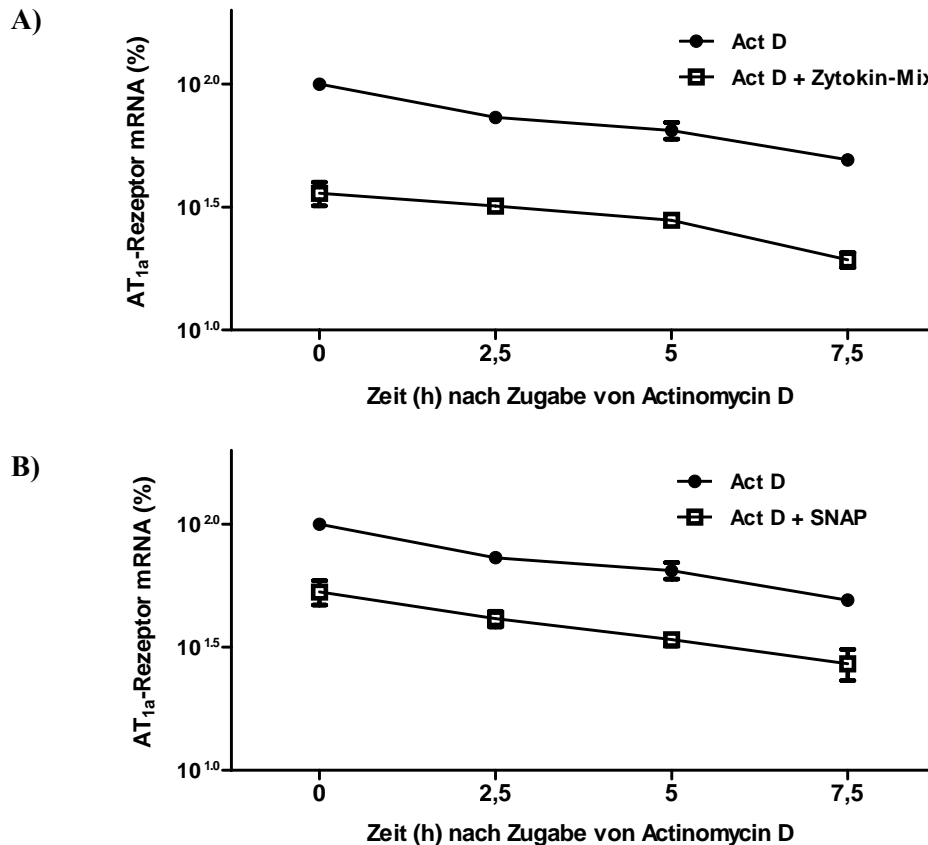


Abb. 3.12 Einfluß von (A) Zytokin-Mix bzw. (B) NO-Donor SNAP auf die Stabilität der AT_{1a}-Rezeptor mRNA

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden ohne (Kontrolle) oder mit (A) Zytokin-Mix aus IFN- γ à 100 ng/mL, IL-1 β à 50 ng/mL und TNF- α à 100 ng/mL (für 12h) bzw. (B) 0,2 mM SNAP (für 8h) vorinkubiert. Anschließend wurden zur Hemmung der Transkription 4 μ g/mL Actinomycin D (Act D) zugegeben. Die Abundanz der AT_{1a}-Rezeptor mRNA wurde vor (0h) und 2½, 5 und 7½ h nach Zugabe von Act D mittels Real Time RT-PCR bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 3 Proben pro Gruppe.

Wie man der Abbildung 19 entnehmen kann, änderte sich bei Inkubation der glatten Gefäßmuskelzellen mit dem (A) Zytokin-Mix bzw. mit dem (B) NO-Donor im Vergleich zur Kontrolle die Stabilität der AT_{1a}-Rezeptor mRNA nicht.

Eine weitere Möglichkeit, die Expression von mRNA zu regulieren, basiert auf der Kontrolle der Gen-Transkription.

3.3 Promotor-Daten

3.3.1 Generierung des Promotor-Konstrukts p3,55kb

Um festzustellen, ob die Genexpression des AT_{1a}-Rezeptors auf der Transkriptions-Ebene reguliert wird, wurde als erstes das Reporter-Konstrukt p3,55kb mit einem 3,55kb großen Promotor-Bereich des Rezeptors generiert.

Der klonierte Promotor entspricht dabei der Sequenz von -3545bp bis -1bp vom Transkriptions-Startpunkt der AT_{1a}-Rezeptor mRNA.

Als Reporter-Vektor diente hier pGL3-Basic: ein Vektor, der das Gen der *firefly* Luziferase (aus dem Leuchtkäfer) enthält.



Die Aktivität der Luziferase steht im direkten Verhältnis zur Menge des Luziferase-Proteins, welches in Abhängigkeit der Promotor-Aktivität gebildet wird.

3.3.1.1 Basale Promotor-Aktivität des p3,55kb-Plasmids

Das Promotor-Konstrukt p3,55kb wurde in die glatten Gefäßmuskelzellen transfiziert und die Zellen anschließend für 24h inkubiert.

Parallel dazu wurden die Zellen mit dem Reporter-Vektor pGL3-Basic ohne eingefügten Promotor transfiziert und ebenso für 24h inkubiert (Abb. 3.13).

Die Luziferase-Aktivität (relative light unit, RLU) wurde in einem Dual Luziferase-Assay mit Hilfe eines Luminometers gemessen.

So konnte überprüft werden, ob der Promotor des p3,55kb-Plasmids intakt ist und ob pGL3-Basic eine Hintergrund-Aktivität besitzt.

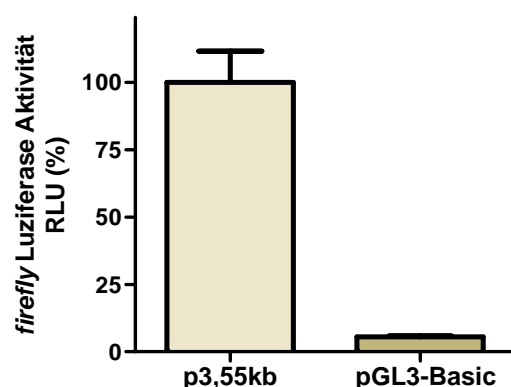


Abb. 3.13 Basale *firefly* Luziferase-Aktivität

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden mit dem generierten Promotor-Konstrukt p3,55kb bzw. mit dem Vektor pGL3-Basic ohne inserierten Promotor transfiziert und anschließend für weitere 24h inkubiert. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von $n = 4$ Proben pro Gruppe.

In der Abbildung 3.13 sind die basalen Luziferase-Aktivitäten der beiden untersuchten Plasmide dargestellt.

Wie man sieht, weisen beide Plasmide eine Luziferase-Aktivität auf, jedoch ist die des generierten Promotor-Konstrukts ca. 17-fach höher und läßt damit auf seine Intaktheit schließen.

In den folgenden Versuchen wurden die Zellen zusätzlich zu den generierten Promotor-Konstrukten mit dem Referenz-Reporter-Vektor pRL-CMV zur internen Kontrolle transfiziert.

Der Vektor pRL-CMV enthält das Gen für die *renilla* Luziferase, dem der Zytomegalievirus-Promotor vorgeschaltet ist, der für eine konstitutive Basal-Expression der *renilla* Luziferase sorgt.

Durch die Co-Transfektion des Referenz-Reporter-Vektors wird ein Abgleich der *firefly* Luziferase-Aktivität zur *renilla* Luziferase-Aktivität ermöglicht und damit eine gleichmäßige Transfektions-Effizienz gewährleistet.

Da beide Luziferasen eine unterschiedliche Substrat-Spezifität haben, konnten beide Aktivitäten in einem Reaktionsansatz gemessen werden.

Bei den Messungen wurde das Verhältnis der Aktivität der *firefly* Luziferase zu der Aktivität der *renilla* Luziferase (RLU/RLU) angegeben.

3.3.1.2 Regulation der Promotor-Aktivität des p3,55kb-Plasmids

3.3.1.2.1 Zytokin-Mix aus IFN- γ , IL-1 β und TNF- α

Der Mix aus den drei Zytokinen IFN- γ (100 ng/mL), IL-1 β (50 ng/mL) und TNF- α (100 ng/mL) hatte bezüglich der mRNA Expression des AT_{1a}-Rezeptors den größten inhibitorischen Effekt: die Expression der Rezeptor mRNA wurde 24h nach Gabe der Zytokine auf 8% bis 10% herabreguliert (s. Abb. 3.2-B und Abb. 3.3-A).

Aufgrund dessen wurde als erstes überprüft, ob der Mix aus diesen drei Zytokinen einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität des 3,55kb großen AT_{1a}-Rezeptor Promotors hat. Gleichzeitig wurde eine Konzentrationsreihe durchgeführt, wobei Verdünnungen aus dem Zytokin-Mix aus IFN- γ (100 ng/mL), IL-1 β (50 ng/mL) und TNF- α (100 ng/mL) hergestellt wurden, welcher 100% der Zytokin-Konzentration entspricht.

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden für 24h mit den verschiedenen Verdünnungen des Zytokin-Mix inkubiert.

Wie man in der Abbildung 3.14 sieht, ergab sich eine deutliche Konzentrations-Abhängigkeit, wobei die halb-maximale Hemmwirkung des Zytokin-Mix (IC₅₀) auf die Promotor-Aktivität des AT_{1a}-Rezeptors bei ca. 1% der oben genannten Dosis lag (1% \pm 1 ng/mL IFN- γ , 0,5 ng/mL IL-1 β und 1 ng/mL TNF- α).

Inkubierte man die Zellen mit einem 0,1%-, 1%-, 10%- bzw. 100%-igen Zytokin-Mix, wurde die Promotor-Aktivität auf ca. 93%, 49%, 29% bzw. 19% gehemmt.



Abb. 3.14 Konzentrations-abhängiger Effekt des Zytokin-Mix auf die Promotor-Aktivität des p3,55kb-Plasmids

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden mit dem p3,55kb-Plasmid transfiziert und für 24h mit dem Zytokin-Mix aus IFN- γ à 100 ng/mL, IL-1 β à 50 ng/mL und TNF- α à 100 ng/mL in folgenden Verdünnungen inkubiert: 0,1% / 1% / 10% / 100%. Die Luciferase-Aktivität ist angegeben als die Aktivität (RLU) der *firefly* Luciferase im Verhältnis zur Aktivität (RLU) der *renilla* Luciferase. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 8 Proben pro Gruppe. * p < 0,05 vs. Kontrolle.

3.3.1.2.2 Zytokin-Kombinationen sowie der NO-Donor SNAP

Nachdem gezeigt werden konnte, daß der Zytokin-Mix aus IFN- γ (100 ng/mL), IL-1 β (50 ng/mL) und TNF- α (100 ng/mL) die Aktivität des 3,55kb großen AT_{1a}-Rezeptor Promotors auf ca. 19% herabreguliert, sollte außerdem geklärt werden, ob die Zytokine IFN- γ , IL-1 β und TNF- α auch einzeln bzw. in verschiedenen Kombinationen, und ob der NO-Donor SNAP einen Einfluß auf die Promotor-Aktivität des p3,55kb-Plasmids haben. Dazu wurden die glatten Gefäßmuskelzellen mit dem p3,55kb-Plasmid transfiziert und anschließend für 24h mit den oben genannten Substanzen inkubiert.

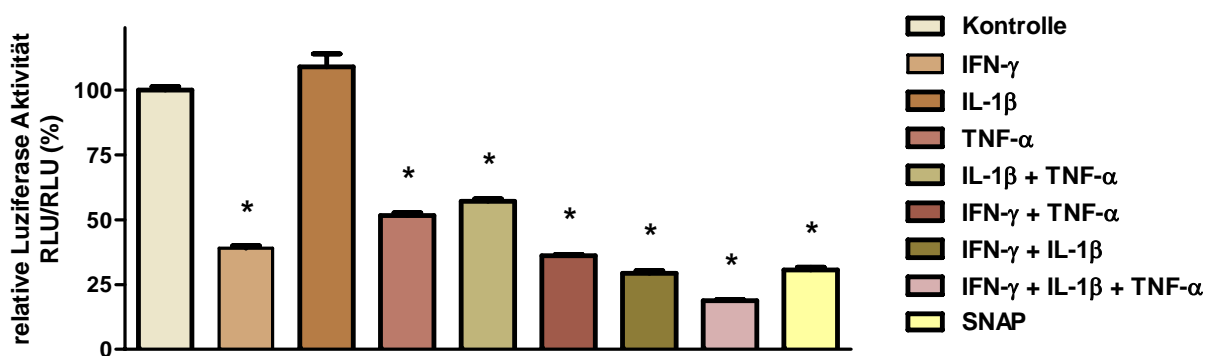


Abb. 3.15 Aktivität des 3,55kb großen Promotors des AT_{1a}-Rezeptor Gens

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden mit dem generierten Promotor-Konstrukt p3,55kb transfiziert und anschließend für 24h mit 0,2 mM SNAP bzw. mit den Zytokinen IFN- γ à 100 ng/mL, IL-1 β à 50 ng/mL und TNF- α à 100 ng/mL einzeln bzw. in Kombination inkubiert.

Die Luciferase-Aktivität ist angegeben als die Aktivität (RLU) der *firefly* Luciferase im Verhältnis zur Aktivität (RLU) der *renilla* Luciferase.

Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 3 Proben pro Gruppe. * p < 0,05 vs. Kontrolle.

In der oberen Abbildung kann man sehen, daß die Aktivität des 3,55kb großen AT_{1a}-Rezeptor Promotors vom Zytokin IL-1 β allein nicht beeinflusst wurde. Die Zytokine IFN- γ und TNF- α verringerten die Promotor-Aktivität jeweils auf 39% bzw. 49%.

Die Zytokin-Kombinationen aus IL-1 β + TNF- α , IFN- γ + TNF- α und IFN- γ + IL-1 β führten jeweils zu einer Herabregulation der Promotor-Aktivität auf ungefähr 57%, 36% bzw. 29%.

Der Mix aus den drei Zytokinen IFN- γ , IL-1 β und TNF- α hatte den stärksten Effekt: die Promotor-Aktivität wurde auf ca. 19% gehemmt.

Bei Behandlung der Zellen mit dem NO-Donor SNAP wurde die Promotor-Aktivität auf ungefähr 31% verringert.

3.3.2 Generierung von Deletions-Konstrukten

- p3,55kb, p1,55kb, p0,20kb und p0,075kb -

Um die regulatorischen Sequenzen, welche für die verminderte Promotor-Aktivität verantwortlich sind, lokalisieren zu können, wurden Deletions-Konstrukte aus dem p3,55kb-Plasmid hergestellt (Abb. 3.16), wobei der Promotor vom 5'-Ende her deletiert wurde.

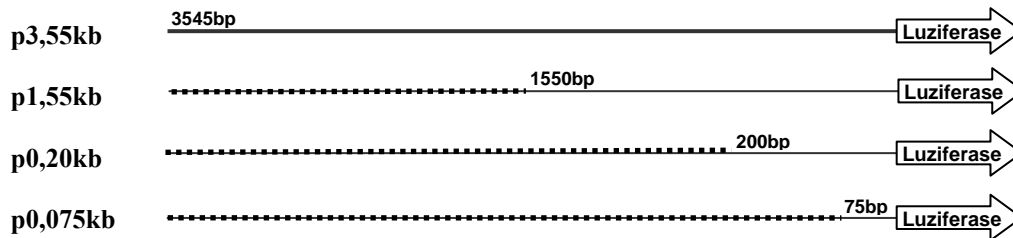


Abb. 3.16 p3,55kb-Plasmid und die daraus generierten Deletions-Konstrukte

Der gepunktete Bereich wurde jeweils herausgeschnitten.

p3,55kb-Plasmid mit 3,55kb großem Promotor; p1,55kb-Plasmid mit 1,55kb großem Promotor usw...

3.3.2.1 Aktivität der Promotor-Konstrukte

bei Gabe des Zytokin-Mix aus IFN- γ , IL-1 β und TNF- α

Die Gefäßmuskelzellen wurden mit dem p3,55kb-Plasmid und den Deletions-Konstrukten p1,55kb, p0,20kb und p0,075kb transfiziert und anschließend für 24h mit dem Zytokin-Mix aus IFN- γ , IL-1 β und TNF- α inkubiert (Abb. 3.17).

Wie man in der unteren Abbildung sehen kann, wurde die Promotor-Aktivität des Plasmids p3,55kb auf ca. 19%, p1,55kb auf rund 16% und p0,20kb auf 67% gesenkt. Die Aktivität des 75bp großen Promotors im p0,075kb-Plasmid blieb im Vergleich zur Kontrolle unverändert.

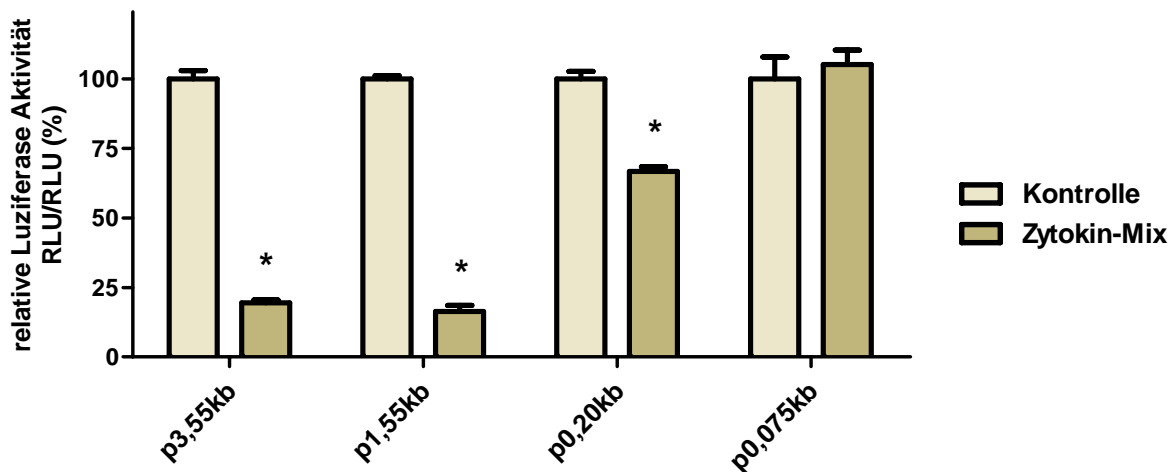


Abb. 3.17 Einfluß des Zytokin-Mix auf die Aktivität der Promotor-Konstrukte

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden mit den Promotor-Konstrukten p3,55kb, p1,55kb, p0,20kb bzw. p0,075kb transfiziert und anschließend für 24h mit dem Zytokin-Mix aus IFN- γ à 100 ng/mL, IL-1 β à 50 ng/mL und TNF- α à 100 ng/mL inkubiert.

Die Luziferase-Aktivität ist angegeben als die Aktivität (RLU) der *firefly* Luziferase im Verhältnis zur Aktivität (RLU) der *renilla* Luziferase.

Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 8 Proben pro Gruppe. * p < 0,05 vs. Kontrolle.

3.3.2.2 Aktivität der Promotor-Konstrukte bei Gabe des Zytokins IFN- γ

Es sollte untersucht werden, in welchem Bereich des Promotors die regulatorischen Sequenzen liegen, über die der inhibitorische Effekt von IFN- γ vermittelt wird.

Dazu wurden die Gefäßmuskelzellen wiederum mit dem p3,55kb-Plasmid bzw. den Dele-tions-Konstrukten transfiziert und anschließend für 24h mit IFN- γ inkubiert (Abb. 3.18).

Wie man sieht, wurden die Aktivitäten des 3,55kb und des 1,55kb großen Promotor-Fragments auf ca. 40% bzw. 38% gehemmt.

Die Promotor-Aktivitäten des p0,20kb- und des p0,075kb- Plasmids wurden durch IFN- γ auf jeweils 89% und 90% herabreguliert.

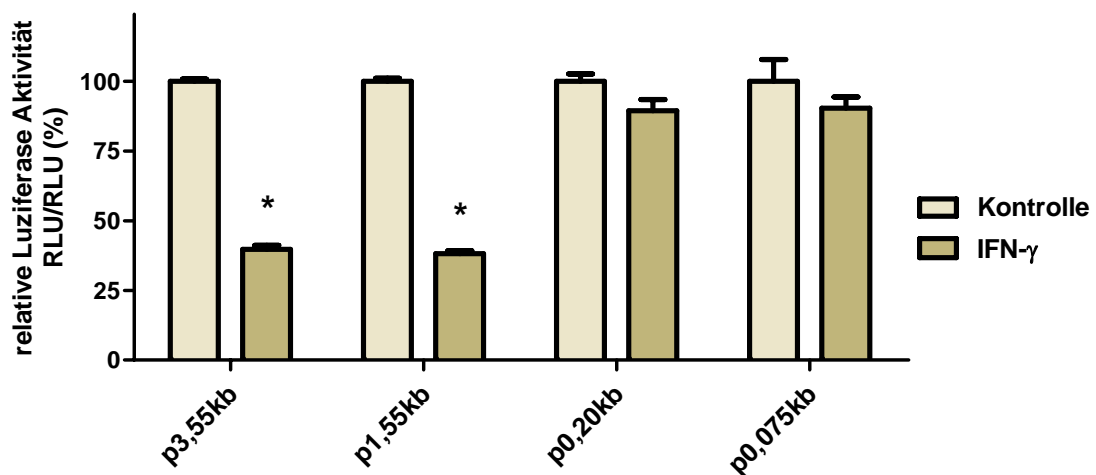


Abb. 3.18 Einfluß des Zytokins IFN- γ auf die Aktivität der Promotor-Konstrukte

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden mit den Promotor-Konstrukten p3,55kb, p1,55kb, p0,20kb bzw. p0,075kb transfiziert und anschließend für 24h mit dem Zytokin IFN- γ à 100 ng/mL inkubiert. Die Luciferase-Aktivität ist angegeben als die Aktivität (RLU) der *firefly* Luciferase im Verhältnis zur Aktivität (RLU) der *renilla* Luciferase.

Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 8 Proben pro Gruppe. * p < 0,05 vs. Kontrolle.

3.3.2.3 Aktivität der Promotor-Konstrukte bei Gabe des Zytokins TNF- α

Die Gefäßmuskelzellen wurden mit dem p3,55kb-Plasmid bzw. den Deletions-Konstrukten transfiziert und anschließend für 24h mit TNF- α inkubiert (Abb. 3.19).

Wie man in der unteren Abbildung sieht, wurde die Aktivität des 3,55kb großen Promotor-Fragments auf ca. 49% gehemmt.

Die Promotor-Aktivitäten des p1,55kb- und des p0,20kb-Plasmids wurden durch TNF- α signifikant auf jeweils 69% herabreguliert. Die Aktivität des 75bp großen Promotors betrug bei Gabe des Zytokins TNF- α ca. 90%.

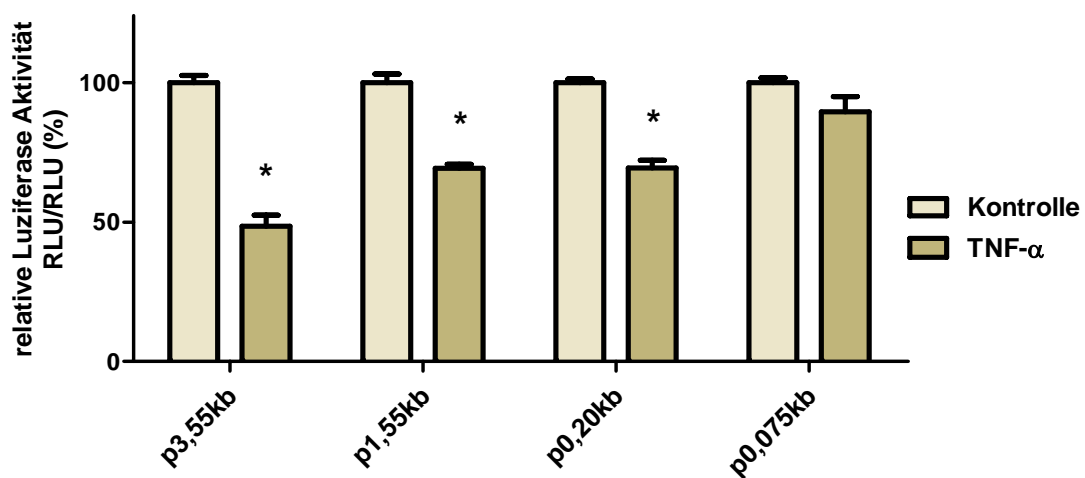


Abb. 3.19 Einfluß des Zytokins TNF- α auf die Aktivität der Promotor-Konstrukte

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden mit den Promotor-Konstrukten p3,55kb, p1,55kb, p0,20kb bzw. p0,075kb transfiziert und anschließend für 24h mit dem Zytokin TNF- α à 100 ng/mL inkubiert. Die Luziferase-Aktivität ist angegeben als die Aktivität (RLU) der *firefly* Luziferase im Verhältnis zur Aktivität (RLU) der *renilla* Luziferase. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 8 Proben pro Gruppe. * p < 0,05 vs. Kontrolle.

3.3.2.4 Aktivität der Promotor-Konstrukte bei Gabe von NO

In diesem Versuchs-Ansatz sollte geklärt werden, in welchem Promotor-Bereich Stickstoffmonoxid eine Hemmung der Promotor-Aktivität vermittelt.

Die Zellen wurden mit den zu untersuchenden Promotor-Konstrukten transfiziert und für 24h mit dem NO-Donor SNAP inkubiert.

Die Aktivität des 3,55kb (1,55kb, 0,20kb) großen Promotor-Stücks wurde auf 31% (34%, 48%) verringert. In dem 75bp großen Promotor wurde die transkriptionelle Aktivität auf ca. 85% herabreguliert.

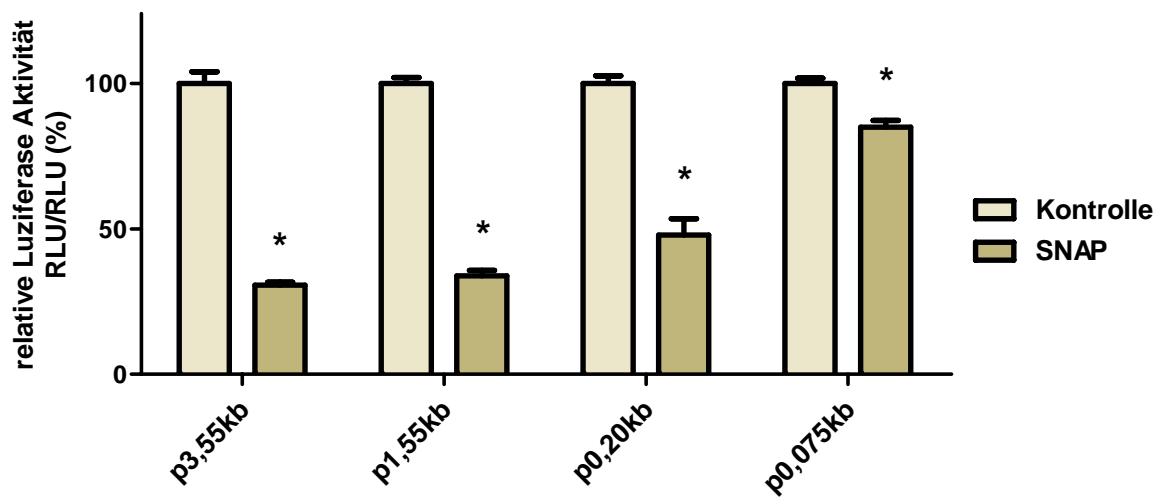


Abb. 3.20 Einfluß des NO-Donors SNAP auf die Aktivität der Promotor-Konstrukte

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden mit den Promotor-Konstrukten p3,55kb, p1,55kb, p0,20kb bzw. p0,075kb transfiziert und anschließend für 24h mit dem NO-Donor SNAP à 0,2 mM inkubiert.

Die Luziferase-Aktivität ist angegeben als die Aktivität (RLU) der *firefly* Luziferase im Verhältnis zur Aktivität (RLU) der *renilla* Luziferase.

Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 8 Proben pro Gruppe. * p < 0,05 vs. Kontrolle.

3.4 AT₁-Rezeptor vermittelte Ca²⁺-Freisetzung

Im folgenden Versuchs-Ansatz sollte als erstes geklärt werden, ob die Gefäßmuskelzellen einen funktionellen AT₁-Rezeptor besitzen.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, vermittelt Ang II über den AT₁-Rezeptor eine Kalzium-Freisetzung aus internen Speichern der Zelle ins Zytosol. Und diesen Kalzium-Anstieg kann man mit Hilfe der Fura-2 Methode messen.

3.4.1 Wirkung von Ang II zusammen mit PD123319 bzw. Losartan

Es sollte geklärt werden, ob die Gefäßmuskelzellen bei Gabe von Angiotensin II Kalzium ins Zytosol freisetzen. Wenn ja, sollte zudem sichergestellt werden, daß die Freisetzung des Kalziums über den AT₁-Rezeptor, und nicht etwa über den AT₂-Rezeptor, vermittelt wird.

Für die Messung des Ca²⁺ im Zytosol wurden die Gefäßmuskelzellen mit 4 µM Fura-2 für 2h bei 37°C beladen.

Zum einen wurden die Zellen über die ganze Zeit während einer Messung mit PD123319, einem spezifischem Blocker des AT₂-Rezeptors, beladen. Gab man für eine Minute Ang II zu, stieg die Kalzium-Menge in der Zelle an (Abb. 3.21).

Zum anderen wurde den Zellen Losartan, ein spezifischer AT₁-Rezeptor-Antagonist, zugegeben. Bei Gabe von Ang II kam es zu keiner Änderung der intrazellulären Kalzium-Menge (Abb. 3.21).

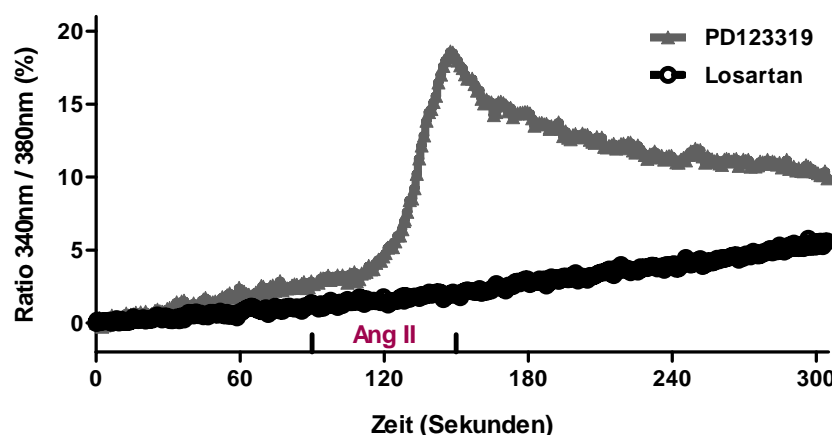


Abb. 3.21

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden für 2h bei 37°C mit 4 µM Fura-2/AM in Ringer beladen. Anschließend wurde im Beisein von 10 µM PD123319 bzw. 10 µM Losartan für 1 Minute Ang II zugegeben (Start bei 90 Sekunden). Der Anstieg zytosolischer Ca²⁺-Konzentration ist als Ratio angegeben: gebundenes Fura-2 bei 340 nm zu ungebundenem Fura-2 bei 380 nm. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM von n = 5 Zellen.

3.4.2 Wirkung von Ang II bei Zytokin-behandelten Zellen

Nachdem geklärt werden konnte, daß die Zellen einen funktionellen AT₁-Rezeptor besitzen, sollte untersucht werden, ob die verminderte Expression des Rezeptors bei den Zytokin-behandelten Zellen eine veränderte Ca²⁺-Freisetzung zur Folge hat (Abb. 3.22).

Die Gefäßmuskelzellen wurden für 24h mit dem Zytokin-Mix aus IFN- γ , IL-1 β und TNF- α inkubiert und anschließend wurde der Fura-Assay durchgeführt.

In der unteren Abbildung kann man sehen, daß die Zytokin-behandelten Zellen - im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen - trotz Gabe von 100 nM Angiotensin II kein Ca²⁺ ins Zytosol freisetzen.

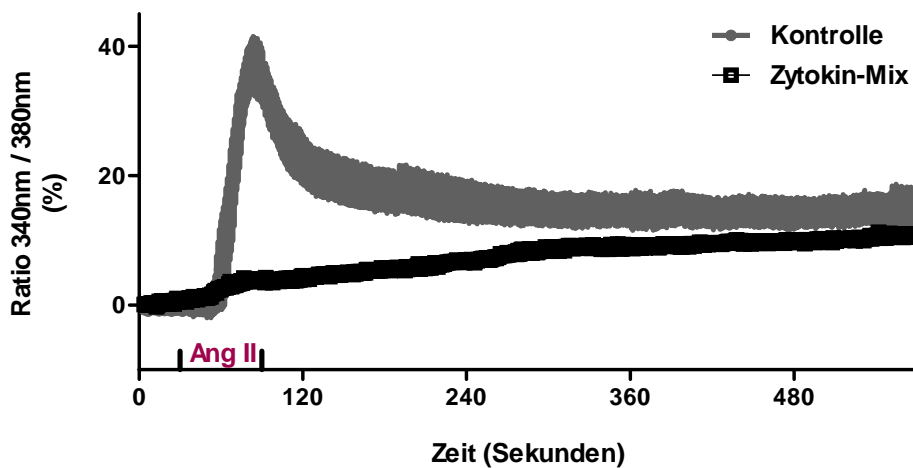


Abb. 3.22 Einfluß von Ang II auf die zytosolische Kalzium-Menge bei Zytokin-behandelten Zellen

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden mit dem 3er Zytokin-Mix aus IFN- γ à 100 ng/mL, IL-1 β à 50 ng/mL und TNF- α à 100 ng/mL inkubiert. Dann wurden sie für 2h bei 37°C mit 4 μ M Fura-2/AM in Ringer beladen. Ang II wurde in einer Konzentration von 100 nM für 1 Minute (Start bei 30 Sekunden) zugegeben. Der Anstieg von zytosolischem Ca²⁺ ist als Ratio angegeben: gebundenes Fura-2 bei 340 nm zu ungebundenem Fura-2 bei 380 nm. Angegeben sind die Mittelwerte \pm SEM von n = 5 Zellen.

4. DISKUSSION

4.1 mRNA-Daten

Einfluß der Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ auf die Expression des AT_{1a}-Rezeptors

Zunächst wurden anhand von Dosis-Zeit-Wirkungskurven die optimalen Wirkbedingungen für die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ bestimmt.

Die Zytokine TNF- α und IFN- γ führten in den glatten Gefäßmuskelzellen nach 24h jeweils zu einer Herabregulation der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression auf 50%. IL-1 β dagegen hatte keinen Einfluß auf die Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA (s. Abb. 3.5-B).

In Kombination mit IL-1 β wurde die durch TNF- α bedingte Hemmung der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression abgeschwächt: die Expression wurde nur noch auf 70% herabreguliert.

Die Hemmung der mRNA Expression durch IFN- γ wurde jedoch durch IL-1 β auf ungefähr 20% verstärkt.

Die beiden Zytokine IFN- γ und TNF- α unterdrückten die Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA auf ca. 15%.

Den stärksten Effekt hatte die Kombination der drei Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ .

Die mRNA Abundanz des AT_{1a}-Rezeptors lag nur noch bei ungefähr 8,5% im Vergleich zur Kontrolle.

Diese Daten deuten darauf hin, daß diese Zytokine die Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA nicht einfach nur in additiver, sondern in synergistischer Weise beeinflussen.

Diese Befunde sind zum Teil widersprüchlich zu dem, was andere Arbeitsgruppen gefunden haben. So zeigten Gurantz et al. (1999) und Cowling et al. (2005) in ihren Arbeiten, daß TNF- α und IL-1 β jeweils die Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA in kardialen Fibroblasten der Ratte hochregulierten. Die Arbeitsgruppe Bucher jedoch fand in der Niere von Mäusen, die mit TNF- α bzw. mit IL-1 β behandelt wurden, eine Herabregulation der Rezeptor mRNA Expression (persönliche Mitteilung).

In Experimenten mit der humanen Hepatoma-Zelllinie Hep3B wurde gezeigt, daß IFN- γ die mRNA Expression des AT₁-Rezeptors erhöhte (Jain et al., 2006), während an immortalisierten glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte die Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA durch IFN- γ unterdrückt wurde (Ikeda et al., 1999).

Die stark gehemmte Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA durch die Kombination der drei oben genannten Zytokine wurde auch in der Arbeit von Bucher et al. (2001) beschrieben, in welcher die Versuche an Mesangial-Zellen der Ratte durchgeführt wurden; außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß parallel zur mRNA Expression des AT_{1a}-Rezeptors

auch die Menge des AT₁-Rezeptor Proteins herabreguliert wurde. Die Herabregulation der AT₁-Rezeptor Protein Menge durch diese Zytokin-Kombination wurde auch von Sasamura et al. (1997) in glatten Gefäßmuskelzellen beschrieben.

Aus diesen Daten kann man folgern, daß die durch den Zytokin-Mix gehemmte mRNA Expression des AT_{1a}-Rezeptors eine verminderte Synthese des AT₁-Rezeptor Proteins zur Folge hat.

Die aufgeführten Befunde einer erhöhten mRNA Expression des AT₁-Rezeptors widersprechen den Ergebnissen in dieser Arbeit jedoch nicht notwendigerweise, da in diesen Studien zum Teil geringere Zytokin-Dosierungen verwendet wurden. Spezielle Kombinations-, Zeit- und Zelltyp-Abhängigkeiten könnten ebenso die Widersprüchlichkeit der Befunde erklären.

Einfluß des Stickstoffmonoxids auf die Expression des AT_{1a}-Rezeptors

Wie bereits erwähnt, wird bei der Vermittlung der arteriellen Hypotension während Sepsis Stickstoffmonoxid eine maßgebliche Rolle zugeordnet.

Um den Einfluß von NO auf die Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem NO-Donor SNAP inkubiert.

Die Expression der Rezeptor mRNA wurde durch SNAP Zeit- und Konzentrationsabhängig gehemmt. Der Befund der Herabregulation durch NO stimmt überein mit den Arbeiten von Ichiki et al. (1998), Bucher et al. (2001) und Nithipatikom et al. (2004). Außerdem wurde in dieser Arbeit untersucht, welche Rolle endogen gebildetes NO, das bei Behandlung der Zellen mit dem Zytokin-Mix aus IL-1 β , TNF- α und IFN- γ durch die induzierte NOS II gebildet wird, bei der verminderten Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA hatte. Dazu wurden die glatten Gefäßmuskelzellen mit dem oben genannten Zytokin-Mix zusammen mit L-NAME, einem Inhibitor der endogenen NO-Bildung, inkubiert.

Die mRNA Expression des AT_{1a}-Rezeptors wurde durch den Einfluß des Zytokin-Mix auf ca. 8% herabreguliert. Eine Inkubation der Zellen mit dem Zytokin-Mix in Kombination mit 1 mM L-NAME bzw. 5 mM L-NAME verminderte die Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA auf ca. 17% bzw. 25% (s. Abb. 3.8).

Dieser Befund zeigt, daß die Hemmung der mRNA Expression des AT_{1a}-Rezeptors durch den Zytokin-Mix durch Blockade der NO-Bildung nicht aufgehoben werden konnte.

Diese Daten stimmen überein mit den Befunden aus der Arbeit von Bucher et al. (2001).

Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, daß die Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA durch den Zytokin-Mix und auch durch NO in synergistischer Weise herabreguliert wurde, daß aber die Zytokine weitere Signaltransduktionswege aktivieren, welche die Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA regulieren.

Bedeutung der MAP-Kinase-Signaltransduktionswege

Eine der bekanntesten Signalweg-Familien ist die Gruppe der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK), die u.a. über Mitogene, Streß und Zytokine (Arbabi und Maier, 2002; Johnson und Lapadat, 2002) aktiviert werden.

MAP-Kinasen vermitteln über verschiedene Kaskaden Signale von der Zelloberfläche bis in den Zellkern. Die funktionelle Bedeutung der MAP-Kinasen ist vielfältig; sie sind u.a. an der Kontrolle von Embryogenese, Proliferation, Zelldifferenzierung und Regulation von Entzündungsmediatoren beteiligt (Seger und Krebs, 1995; Chang und Karin, 2001; Tibbles und Woodgett, 1999; Xiao et al., 2002).

Die drei wichtigsten MAPK in Säugetierzellen sind die p42/44 MAPK (extrazelluläre signal-regulierte Kinase, ERK1/2), die SAPK/JNK (c-jun N-terminale) und die p38 MAP-Kinase.

In dieser Arbeit sollte daher geklärt werden, ob diese drei MAP-Kinase-Kaskaden an der Hemmung der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression durch den Zytokin-Mix aus IFN- γ , IL-1 β und TNF- α beteiligt waren. Dazu wurden die glatten Gefäßmuskelzellen mit dem Zytokin-Mix in Kombination mit gängigen MAP-Kinase-Inhibitoren inkubiert.

Jedoch konnte durch keinen einzigen MAP-Kinase-Inhibitor die durch den Zytokin-Mix bedingte Herabregulation der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression aufgehoben werden (s. Abb. 3.9).

Ikeda et al. (1999) dagegen konnten in einem Versuch an glatten Gefäßmuskelzellen zeigen, daß die Herabregulation der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression durch IFN- γ durch den Einsatz von PD98059, einem Inhibitor der p42/44 MAP-Kinase, komplett aufgehoben wurde. Dieser Befund ist aber nicht vergleichbar mit dem Befund in dieser Arbeit, denn die glatten Gefäßmuskelzellen wurden nicht mit IFN- γ allein, sondern mit einer Kombination aus den drei Zytokinen IFN- γ , IL-1 β und TNF- α behandelt.

Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Neben den MAP-Kinasen gibt es einen weiteren möglichen Signalweg für die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , IL-1 β und TNF- α . Diese können den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren (Narumi et al., 1992; Saldeen und Welsh, 1994; Fujisawa et al., 1996), der die transkriptionelle Expression von über 200 Genen reguliert (Pahl, 1999). Diese Gene spielen eine wichtige Rolle bei der Zell-Proliferation, der Immunantwort und der Entstehung und Perpetuierung einer Entzündungsreaktion (Chen und Greene, 2004; Ghosh et al., 1998). Zu den Zielgenen, die von NF- κ B reguliert werden, gehören unter anderem die Zytokine TNF- α und IL-1 β (Collins et al., 1995; Senftleben und Karin, 2002) und die induzierbare NO-Synthase NOS II (Xie et al., 1994).

In dieser Arbeit sollte daher geklärt werden, ob die Herabregulation der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression unter dem Einfluß der Zytokin-Kombination aus IFN- γ , IL-1 β und TNF- α über den Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt wurde. Dazu wurden die Gefäßmuskelzellen mit dem Zytokin-Mix in Kombination mit PDTC, einem nicht-selektiven NF- κ B-Inhibitor, behandelt. Die NOS II mRNA Expression diente als Positiv-Kontrolle, da bekanntermaßen NF- κ B diese Stickstoffmonoxid-Synthase induziert.

Der NF- κ B-Inhibitor PDTC senkte die durch den Zytokin-Mix induzierte NOS II mRNA Expression bei einer Konzentration von 1,0 mM auf ca. 35% (s. Abb. 3.10); dieser Befund zeigt, daß NF- κ B durch PDTC effektiv gehemmt werden konnte. Die Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA wurde jedoch trotz PDTC genauso stark gehemmt wie in den Zytokin-behandelten Zellen ohne PDTC.

Einerseits lassen diese Daten vermuten, daß die Herabregulation der AT_{1a}-Rezeptor mRNA nicht durch NF- κ B vermittelt wird. Für diesen Befund würde auch sprechen, daß durch NF- κ B in der Regel die Expression der Zielgene hochreguliert wird.

Andererseits wäre es möglich, daß der Mix aus den drei Zytokinen eine dermaßen starke Wirkung auf die Gefäßmuskelzellen hatte, daß die Konzentration des PDTC von 1,0 mM nicht ausreichte, die Aktivierung des NF- κ B komplett zu unterdrücken. Für diese Möglichkeit würde sprechen, daß die mRNA Expression der NOS II durch die Zytokine auf das 10⁵-fache hochreguliert wurde (s. Abb. 3.10), und daß diese starke Induktion der NOS II mRNA durch 1,0 mM PDTC nur zu 65% gehemmt wurde. Es wäre möglich, daß durch den Zytokin-Mix trotz PDTC immer noch genügend NF- κ B aktiviert wurde, um die Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA zu hemmen.

Bei den Versuchen konnte leider keine höhere Konzentration des PDTC eingesetzt werden, weil dies zu einem Absterben der Zellen führte.

mRNA Stabilität

Die Hemmung der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression in den glatten Gefäßmuskelzellen als Folge einer Behandlung mit dem Zytokin-Mix aus IFN- γ , IL-1 β und TNF- α bzw. mit dem NO-Donor SNAP kann prinzipiell durch eine Hemmung der Transkription des AT_{1a}-Rezeptor Gens oder aber durch eine Destabilisierung der AT_{1a}-Rezeptor mRNA ausgelöst werden.

In der Arbeit von Wang et al. (1997) wurde eine Herabregulation der AT₁-Rezeptor mRNA Expression durch Forskolin, einem Aktivator der Adenylatcyclase, beschrieben. Die verminderte Expression der Rezeptor mRNA durch Forskolin kam dabei durch eine Destabilisierung der mRNA zustande; die Halbwertszeit der AT₁-Rezeptor mRNA wurde dabei von ca. sechs Stunden auf ungefähr drei Stunden verkürzt.

Um die Möglichkeit einer Destabilisierung der mRNA durch den Zytokin-Mix bzw. durch NO zu überprüfen, wurden die Zellen mit den Zytokinen bzw. mit SNAP für zwölf bzw. acht Stunden vorinkubiert. Anschließend wurde Actinomycin D zugegeben, um die Transkription in den Zellen zu hemmen. Jedoch gab es keine Unterschiede in der Halbwertszeit der AT_{1a}-Rezeptor mRNA aus den Gefäßmuskelzellen, die mit dem Zytokin-Mix bzw. dem NO-Donor behandelt wurden, gegenüber der mRNA aus unbehandelten Zellen (s. Abb. 3.12).

Dieser Befund läßt darauf schließen, daß die Herabregulation der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression durch die Zytokine IFN- γ , IL-1 β und TNF- α sowie durch NO nicht auf eine Destabilisierung der mRNA zurückzuführen ist.

In der Arbeit von Ichiki et al. (1998) wurde eine Hemmung der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression durch Stickstoffmonoxid beschrieben, die nicht auf einer Destabilisierung der mRNA beruhte, sondern auf einer Hemmung der transkriptionellen Aktivität des AT_{1a}-Rezeptor Gens.

Weitere Arbeiten von Ikeda et al. (1999), Cowling et al. (2005) und Gurantz et al. (1999) zeigten, daß das AT_{1a}-Rezeptor Gen durch die Zytokine IFN- γ , IL-1 β und TNF- α auf transkriptioneller Ebene reguliert wurde.

4.2 Promotor-Daten

Um eine Regulation der Promotor-Aktivität des AT_{1a}-Rezeptor Gens durch die Zytokine IFN- γ , IL-1 β und TNF- α bzw. durch Stickstoffmonoxid zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein 3,55kb großer Promotor-Bereich in den Reporter-Vektor pGL3-Basic kloniert; der klonierte Bereich des Promotors erstreckt sich von -3545bp bis -1bp vom Transkriptions-Startpunkt des AT_{1a}-Rezeptor Gens.

Die transkriptionelle Aktivität des AT_{1a}-Rezeptor Gens wurde durch IFN- γ auf 39%, durch TNF- α auf 49% und durch NO auf 31% gehemmt. IL-1 β hatte keinen Einfluß auf die Aktivität des Promotors (s. Abb. 3.15), wie es auch bei der mRNA Expression des AT_{1a}-Rezeptors schon der Fall war (s. Abb. 3.5-B).

IFN- γ hemmte zusammen mit IL-1 β die transkriptionelle Aktivität auf 29%; TNF- α und IL-1 β bzw. TNF- α und IFN- γ führten zu einer Hemmung auf 57% bzw. 36%.

Den stärksten inhibitorischen Effekt auf Promotor-Ebene hatte der Zytokin-Mix aus IFN- γ , IL-1 β und TNF- α : die Aktivität wurde auf ca. 19% verringert.

Diese Daten zeigen, wie bereits bei der mRNA Expression des AT_{1a}-Rezeptors, daß die Zytokine einen synergistischen Einfluß auf die Promotor-Aktivität ausübten.

Der inhibitorische Effekt von NO auf die transkriptionelle Aktivität des AT_{1a}-Rezeptor Gens wurde auch in der Arbeit von Ichiki et al. (1998) gezeigt.

Die Arbeitsgruppen Gurantz et al. (1999) und Cowling et al. (2005) berichteten in ihrer Arbeit, daß TNF- α die transkriptionelle Aktivität des AT_{1a}-Rezeptor Gens in kardialen Fibroblasten der Ratte erhöhte.

IL-1 β führte in der Arbeit von Ikeda et al. (1999) zu einer Erhöhung der Promotor-Aktivität des AT_{1a}-Rezeptor Gens in glatten Gefäßmuskelzellen.

Jain et al. (2006) zeigten, daß in der humanen Hepatoma-Zelllinie Hep3B die transkriptionelle Aktivität des Rezeptor Gens durch IFN- γ erhöht wurde. Ikeda et al. (1999) dagegen fanden in glatten Gefäßmuskelzellen eine Hemmung der Promotor-Aktivität durch IFN- γ .

Diese teilweise widersprüchlichen Befunde könnten durch Zytokin-Dosierungen und Zelltyp-Abhängigkeiten zustande kommen.

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt wurde, daß die Aktivität des generierten Promotor-Konstrukts p3,55kb (3,55kb großer Promotor im Reporter-Vektor pGL3-Basic) durch die einzelnen Zytokine IFN- γ und TNF- α bzw. durch Stickstoffmonoxid gehemmt wurde, sollte als nächstes geklärt werden, in welchem Bereich des 3,55kb großen Promotors die

regulatorischen Sequenzen liegen, die für die Hemmung der Transkription verantwortlich waren.

Um die regulatorischen Sequenzen des Promotors eingrenzen zu können, wurde der Promotor vom 5'-Ende her gekürzt (s. Abb. 3.16). Die folgenden Konstrukte wurden generiert: p1,55kb, p0,20kb und p0,075kb.

In weiterführenden Versuchen konnten die regulatorischen Sequenzen eingegrenzt werden, die über IFN- γ , TNF- α bzw. NO die Hemmung der Promotor-Aktivität des AT_{1a}-Rezeptor Gens vermittelten.

IFN- γ

Das Zytokin IFN- γ hemmte die Promotor-Aktivität des Konstrukts p1,55kb genauso stark wie die des Konstrukts p3,55kb; in den ersten 200bp bzw. 75bp des Promotors dagegen sah man keine signifikante Veränderung der transkriptionellen Aktivität. Diese Daten deuten darauf hin, daß die regulatorische Sequenz in dem Bereich zwischen -1550bp und -200bp vom Transkriptions-Startpunkt lokalisiert sein mußte.

Ikeda et al. (1999) konnten in ihrer Arbeit die regulatorische Sequenz weiter auf den Bereich zwischen -987bp und -331bp eingrenzen.

In der Promotor-Sequenz von -987 bis -331bp sind potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren vorhanden, die durch IFN- γ reguliert werden.

So gibt es bei -945bp, -908bp, -432bp und -419bp mögliche Bindestellen für den Transkriptionsfaktor C/EBP (CCAAT/Enhancer Bindeprotein) mit der Konsensus-Sequenz 5'-TTNNGNAAT-3' (Johnson und Williams, 1994).

An humanen Haut-Fibroblasten wurde gezeigt, daß die transkriptionelle Aktivität des $\alpha 2$ (I) Prokollagen (COL1A2) Gens durch IFN- γ gehemmt wurde, und daß diese Hemmung über den Transkriptionsfaktor C/EBP β , ein Mitglied der CCAAT/Enhancer Bindeprotein Familie, vermittelt wurde (Ghosh et al., 2006). Die Aktivierung des C/EBP β und damit die Hemmung der Promotor-Aktivität des COL1A2 Gens erfolgte, indem IFN- γ die ERK1/2 MAP-Kinase und diese wiederum den Transkriptionsfaktor C/EBP β durch Phosphorylierung aktivierte.

Ein Vergleich der Daten von Ghosh et al. (2006) und Ikeda et al. (1999) führt zu der Überlegung, ob die transkriptionelle Hemmung des AT_{1a}-Rezeptor Gens auch über C/EBP und dessen Aktivierung durch die ERK1/2 MAP-Kinase vermittelt wird. Dafür würde sprechen, daß potentielle C/EBP-Bindestellen vorliegen und daß IFN- γ keine hemmende Wirkung mehr auf die Promotor-Aktivität ausübte, wenn die ERK1/2 MAP-Kinase

inhibiert wurde (Ikeda et al., 1999). Im Promotor des AT_{1a}-Rezeptor Gens sind neben den potentiellen C/EBP-Elementen auch potentielle GAS-Elemente (gamma interferon activated site) vorhanden, die bei -863bp, -723bp, -569bp, -544bp, -503bp, -367bp und -343bp lokalisiert sind (Ikeda et al., 1999).

Diese GAS-Elemente vermittelten z.B. die transkriptionelle Hemmung des Perlecan Gens (Heparansulfat-Proteoglykan) durch IFN- γ (Sharma und Iozzo, 1998). Auch die Arbeitsgruppe Ramana et al. (2000) schrieb einem GAS-Element im Promotor des c-myc Gens eine große Rolle bei der transkriptionellen Hemmung durch IFN- γ zu. An diese GAS-Elemente bindet der Transkriptionsfaktor STAT1 (signal transducer and activator of transcription). STAT1 wird durch die Tyrosin Kinase Jak-2 (Janus Kinase) aktiviert und erreicht seine maximale Aktivität durch Phosphorylierung an Tyrosin701 und Serin727 (Wen et al., 1995). Ikeda et al. (1999) zeigten in ihrer Arbeit, daß sowohl eine Blockade des ERK1/2 MAP-Kinase abhängigen Signalweges (Serin-Threonin-Tyrosin-Kinase) als auch eine Hemmung des Jak-2 abhängigen Signalweges dazu führten, daß IFN- γ seine hemmende Wirkung auf die Promotor-Aktivität des AT_{1a}-Rezeptor Gens verlor.

Nun stellt sich die Frage, ob die transkriptionelle Hemmung des AT_{1a}-Rezeptor Gens über STAT1 vermittelt wird und in welchem Bezug STAT1 zu der Tyrosin-Kinase Jak-2 und der ERK1/2 MAP-Kinase steht.

In weiterführenden Versuchen muß geklärt werden, ob die potentiellen C/EBP-Elemente und GAS-Motive bei der Hemmung der Promotor-Aktivität des AT_{1a}-Rezeptor Gens durch IFN- γ eine Rolle spielen, oder ob andere regulatorische Sequenzen die Hemmung vermitteln.

TNF- α

Die Promotor-Aktivität des AT_{1a}-Rezeptor-Gens wurde desweiteren auch durch TNF- α gehemmt (s. Abb. 3.19). Die transkriptionelle Aktivität des Konstrukts p3,55kb wurde durch TNF- α auf 49% gehemmt; bei den Konstrukten p1,55kb und p0,20kb wurde die Aktivität auf jeweils 69% herabreguliert; auf die Aktivität des 75bp großen Promotors hatte TNF- α keinen Einfluß.

Goodwin et al. (2007) beschrieben in ihrer Arbeit eine transkriptionelle Hemmung des Arginin-Succinat-Synthase Gens durch TNF- α ; eine große Bedeutung kam dabei dem Transkriptionsfaktor Sp1 zu. Anhand eines Gelshift Assays wurde gezeigt, daß TNF- α eine reduzierte Bindung des Transkriptionsfaktors Sp1 an ein Sp1-Element im Promotor zur Folge hatte, das in ersten 189bp des Promotors lokalisiert ist. Durch Mutation dieser

relevanten Sp1-Sequenz im Promotor wurde zum einen die basale Aktivität auf ca. 4% gehemmt, zum anderen wurde die transkriptionelle Aktivität durch TNF- α nicht mehr beeinflußt.

Einen teilweisen Verlust der basalen Promotor-Aktivität des AT_{1a}-Rezeptor Gens zeigten Kambe et al. (2004), wenn eine der beiden Sp1-Elemente, (-98bp bis -79bp und -58bp bis -34bp) mutiert wurde. Eine Mutation beider Sp1-Motive hatte einen größeren Verlust der basalen Promotor-Aktivität zur Folge.

Auch in dieser Arbeit sah man einen Verlust der basalen Promotor-Aktivität des Konstrukts p0,075kb: der 75bp große Promotor enthält im Vergleich zu den anderen Promotor-Längen nur noch die Sp1-Bindestelle bei -58bp bis -34bp. Der 200bp große Promotor im Konstrukt p0,20kb, der noch beide Sp1-Elemente enthält, wies eine genauso hohe basale Aktivität auf wie die 1,55kb und 3,55kb großen Promotoren und ließ sich durch TNF- α in seiner Aktivität hemmen.

Möglicherweise erfolgte die durch TNF- α bedingte transkriptionelle Hemmung des AT_{1a}-Rezeptor Gens durch eine herabregulierte Bindung des Transkriptionsfaktors Sp1 an das Sp1-Motiv bei -98bp bis -79bp.

TNF- α kann eine Hemmung der Promotor-Aktivität aber auch über eine CRE-Bindestelle (cAMP responsive element) ausüben. So zeigten Todorov et al. (2004), daß die transkriptionelle Hemmung des Renin Gens über NF- κ B vermittelt wurde, wobei dieser Transkriptionsfaktor nicht an ein typisches NF- κ B-Element, sondern an ein CRE-Motiv band.

Eine Untersuchung der Promotor Sequenz des AT_{1a}-Rezeptor Gens mit der Software von Genomatix MatInspector zeigte ein potentiellies CRE-Motiv bei -1202bp bis -1222bp auf. In der Arbeit von Greenwel et al. (2000) wurde die TNF- α bedingte transkriptionelle Hemmung des α 2 (I) Prokollagen (COL1A2) Gens über ein C/EBP-Element reguliert. Dieses C/EBP-Motiv vermittelte auch die transkriptionelle Hemmung durch IFN- γ (Ghosh et al., 2006).

Wie bereits erwähnt, sind im Promotor des AT_{1a}-Rezeptor Gens potentielle C/EBP-Elemente vorhanden.

In weiterführenden Experimenten muß durch weitere Deletions- und Mutations-Konstrukte des AT_{1a}-Rezeptor Promotors geklärt werden, ob TNF- α die Hemmung der transkriptionellen Aktivität über die potentiellen Bindestellen Sp1, CRE bzw. C/EBP vermittelt, oder ob andere Bindestellen dafür verantwortlich sind.

NO

Die Promotor-Aktivität des AT_{1a}-Rezeptor Gens wurde neben den beiden Zytokinen IFN- γ und TNF- α auch durch NO gehemmt.

Die Promotor-Aktivitäten der Konstrukte p3,55kb, p1,55kb, p0,20kb bzw. p0,075kb wurden jeweils auf 31%, 34%, 48% bzw. 85% unterdrückt (s. Abb. 3.20).

Ichiki et al. (1998) fanden in den ersten 61bp des AT_{1a}-Rezeptor Promotors eine transkriptionelle Hemmung auf unter 50% durch NO. Diese Hemmung war viel stärker ausgeprägt als die Hemmung der transkriptionellen Aktivität des Konstrukts p0,075kb in dieser Arbeit. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied könnte die sehr niedrige basale Promotor-Aktivität von p0,075kb sein, womit eine weitere Hemmung durch NO kaum sichtbar gemacht werden konnte.

Ichiki et al. (1998) zeigten mittels eines Gelshift-Assays das Fehlen eines Proteins in NO-behandelten Zellen, welches in den Kontroll-Zellen regulär in der proximalen Promotor-region (in den ersten 61bp) gebunden vorlag. Möglicherweise war die fehlende Bindung dieses Proteins an den proximalen Promotor verantwortlich für die gehemmte Promotor-Aktivität durch NO.

Stickstoffmonoxid verminderte ebenso die Promotor-Aktivität des ICAM-1 Gens (intercellular adhesion molecule-1), indem die Bindung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und AP-1 (activator protein-1) an deren regulatorische Sequenzen im Promotor blockiert wurden (Berendji-Grün et al., 2001).

Der Promotor des AT_{1a}-Rezeptor Gens enthält eine Sp1-Bindestelle bei -58bp bis -34bp. Vielleicht ist es der Transkriptionsfaktor Sp1, der bei Behandlung der glatten Gefäßmuskelzellen mit NO nicht mehr an den Promotor gebunden hat (Ichiki et al., 1998), und so die Promotor-Aktivität herabreguliert wurde.

Wie bereits erwähnt, wurde die transkriptionelle Aktivität des 1,55kb großen Promotors auf 34%, die des 200bp großen Promotors dagegen auf 48% gehemmt.

Es wäre möglich, daß eine weitere regulatorische Sequenz zwischen -1550bp und -200bp existiert, über die zusätzlich eine Hemmung durch NO vermittelt wird.

So gibt es bei -389bp eine potentielle AP-1 Bindestelle, die bei der NO-vermittelten Hemmung der Promotor-Aktivität des ICAM-1 Gens eine Rolle spielte.

Starzynski et al. (2006) beschrieben eine NO-abhängige Hemmung der Promotor-Aktivität des IRP-1 Gens (iron regulatory protein 1), die durch eine Herabregulation der Protein Abundanz von STAT5a und STAT5b (diese Transkriptionsfaktoren gehören zur Familie der STAT Proteine) und deren gehemmte Bindung an ein GAS-Element zustandekam.

Diese potentiellen GAS-Motive sind auch im Promotor des AT_{1a}-Rezeptor Gens vorhanden (Ikeda et al., 1999).

In weiterführenden Versuchen muß daher, wie auch bei den Promotorstudien unter dem Einfluß von IFN- γ und TNF- α , mit Hilfe von Deletions- und Mutations-Konstrukten geklärt werden, ob die erwähnten potentiellen Bindestellen eine Rolle spielen, oder ob ganz andere Motive für die NO-vermittelte Hemmung der Promotor-Aktivität verantwortlich sind.

4.3 AT₁-Rezeptor vermittelte Ca²⁺-Freisetzung

Angiotensin II bewirkt durch Stimulation von AT₁-Rezeptoren an glatten Gefäßmuskelzellen eine Vasokonstriktion. Der AT₁-Rezeptor ist über ein G_q-Protein an eine Phosphoinositid-spezifische Phospholipase C (PLC) gekoppelt. Diese spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), wobei die second messenger Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) entstehen. IP₃ wiederum setzt Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) frei, was einen Anstieg der freien intrazellulären Ca²⁺-Konzentration zur Folge hat. Anschließend wird die Myosin-Leichtkettenkinase über den Komplex Ca²⁺/Calmodulin aktiviert, was schließlich eine Kontraktion der glatten Muskulatur zur Folge hat.

Ausgehend von den Befunden, daß während Sepsis zum einen die Blutdruckantwort auf Angiotensin II reduziert war (Tarpey et al., 1998) und zum anderen in vivo Daten belegen, daß die Expression des AT₁-Rezeptors sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene herabreguliert war (Bucher et al., 2001), sollte in dieser Arbeit auf zellulärer Ebene geklärt werden, ob eine Behandlung der glatten Gefäßmuskelzellen mit der Zytokin-Kombination aus IL-1 β , IFN- γ und TNF- α und der daraus resultierenden verminderten mRNA-Abundanz des AT₁-Rezeptors auch eine reduzierte Ca²⁺-Freisetzung zur Folge hat.

In der Tat zeigte sich, daß Angiotensin II in glatten Gefäßmuskelzellen, die zuvor mit dem Zytokin-Mix behandelt wurden, im Gegensatz zu unbehandelten Zellen keine Ca²⁺-Freisetzung bewirkte (s. Abb. 3.22).

Dies könnte eine sehr gute Erklärung dafür sein, daß Angiotensin II bei Sepsis eine verminderte Blutdruckantwort zeigt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Während Sepsis ist die Blutdruckwirksamkeit des vasokonstriktiven Hormons Angiotensin II deutlich reduziert. Der Mechanismus dieser vaskulären Hyporeaktivität auf Angiotensin II, auch Vasoplegie genannt, ist derzeit nicht schlüssig bekannt.

Untersuchungen am Tiermodell haben gezeigt, daß nach Induktion einer Gram-negativen Sepsis die Expression der AT₁-Rezeptoren unterdrückt war. Möglicherweise liegt die verminderte Blutdruckwirksamkeit von Angiotensin II während Sepsis daher an einer veränderten Genexpression der AT₁-Rezeptoren.

Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, die Regulation des AT_{1a}-Rezeptors durch Sepsis-typische Mediatoren wie proinflammatorische Zytokine und Stickstoffmonoxid auf zellulärer Ebene näher zu charakterisieren.

Als in vitro-Modell wurden in dieser Arbeit primäre glatte Gefäßmuskelzellen aus der Aorta der Ratte verwendet. Die Zytokine TNF- α und IFN- γ wie auch Stickstoffmonoxid führten zu einer Herabregulation der mRNA-Expression des AT_{1a}-Rezeptors, während IL-1 β keinen Einfluß auf die Expression der AT_{1a}-Rezeptor mRNA hatte. Verschiedene Kombinationen dieser drei Zytokine führten alle zu einer Hemmung der Expression, wobei die Herabregulation der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression durch die Kombination aus den drei Zytokinen am stärksten ausfiel.

Es ist bekannt, daß die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IFN- γ und IL-1 β u.a. den Transkriptionsfaktor NF- κ B und die drei wichtigsten MAP-Kinasen - die p42/44, die SAPK/JNK und die p38 - aktivieren. Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde zeigen aber, daß diese bei der Hemmung der AT_{1a}-Rezeptor mRNA Expression durch Zytokine wohl keine Rolle spielen.

Ferner konnte eine Destabilisierung der AT_{1a}-Rezeptor mRNA für die Zytokin- und NO-vermittelte AT_{1a}-Rezeptor Genexpression ausgeschlossen werden. Weiterführende Versuche haben ergeben, daß die verminderte mRNA Expression durch die Zytokine TNF- α und IFN- γ wie auch durch Stickstoffmonoxid auf einer Hemmung der transkriptionellen Aktivität des AT_{1a}-Rezeptor Promotors beruht. Anhand von Promotor-Reporter-Konstrukten konnten die jeweiligen regulatorischen Sequenzen eingegrenzt werden.

Desweiteren wurde in den glatten Gefäßmuskelzellen die Ca²⁺-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol durch Angiotensin II untersucht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Angiotensin II in Zellen, die zuvor mit dem Zytokin-Mix behandelt wurden, im Gegensatz zu unbehandelten Zellen keine Ca²⁺-Freisetzung

bewirkte. Dies könnte eine sehr gute Erklärung dafür sein, daß Angiotensin II bei Sepsis eine verminderte Blutdruckantwort zeigt.

In weiterführenden Versuchen muß mit Hilfe von weiteren Deletionen und Mutationen des AT_{1a}-Rezeptor Promotors geklärt werden, über welche regulatorischen Sequenzen die Hemmung der transkriptionellen Aktivität durch TNF- α , IFN- γ und Stickstoffmonoxid vermittelt wird, und welche Signalwege dafür verantwortlich sind.

6. LITERATURVERZEICHNIS

ACCP/SCCM Consensus Conference Committee (1992)

Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis.

Crit Care Med 20(6): 864-874

Aggarwal B.B. und Natarajan K. (1996)

Tumor necrosis factors: developments during the last decade.

Eur Cytokine Netw 7: 93-124

Alexander C. und Rietschel E.T. (2001)

Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity.

J Endotoxin Res 7(3): 167-202

Angus D.C., Linde-Zwirble W.T., Lidicker J., Clermont G., Carcillo J. und Pinsky M.R. (2001)

Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care.

Crit Care Med 29: 1303-1310

Arbabi S., MD, MPH und Maier R.V., MD (2002)

Mitogen-activated protein kinases.

Crit Care Med 30[Suppl.]: S74-S79

Beal A.L. und Cerra F.B. (1994)

Multiple organ dysfunction syndrome in the 1990s.

Systemic inflammatory response and organ dysfunction.

JAMA 271: 226-233

Berendji-Grün D., Kolb-Bachofen V. und Kröncke K.D. (2001)

Nitric oxide inhibits endothelial IL-1[β]-induced ICAM-1 gene expression at the transcriptional level decreasing Sp1 and AP-1 activity.

Mol Med November; 7(11): 748-754

Boehm U., Klamp T., Groot M. und Howard J.C. (1997)

Cellular responses to interferon-gamma.

Annu Rev Immunol 15: 749-795

Brun-Buisson C., Doyon F., Carlet J., Dellamonica P., Gouin F., Lepoutre A., Mercier J.C., Offenstadt G. und Regnier B. (1995)

Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults.

A multicenter prospective study in intensive care units.

French ICU Group for Severe Sepsis JAMA 274: 968-974

Bucher M., Ittner K.-P., Hobbhahn J., Taeger K. und Kurtz A. (2001)

Downregulation of Angiotensin II Type 1 Receptors During Sepsis.

Hypertension 38: 177-182

Cahill A.P., Redmond E.M., Foster C. und Sitzmann J.V. (1995)

Nitric oxide regulates angiotensin II receptors in vascular smooth muscle cells.

Eur J Pharmacol 288: 219-229

Chang L. und Karin M. (2001)

Mammalian MAP kinase signalling cascades.
Nature Mar 1; 410 (6824): 37-40

Chen L.-F. und Greene W.C. (2004)

Shaping the nuclear action of NF- κ B.
Nature Reviews Molecular Cell Biology 5, 392-401

Churchill (1995)

First and second messengers in renin secretion.
In: Laragh und Brenner:
Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management.
Raven Press pp 1869-1885

Clancy R.M., Amin A.R. und Abramson S.B. (1998)

The role of nitric oxide in inflammation and immunity.
Arthritis Rheum Jul; 41(7): 1141-1151

Collins T., Read M.A., Neish A.S., Whitley M.Z., Thanos D. und Maniatis T. (1995)

Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules:
NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers.
Faseb J 9 (10): 899-909

Cowling R.T., Zhang X., Reese V.C., Iwata M., Gurantz D., Dillmann W.H. und Greenberg B.H. (2005)

Effects of cytokine treatment on angiotensin II type 1A receptor
transcription and splicing in rat cardiac fibroblasts.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 289: H1176-H1183

Crofford L.J., Tan B., McCarthy C.J. und Hla T. (1997)

Involvement of nuclear factor kappa B in the regulation of cyclooxygenase-2
expression by interleukin-1 in rheumatoid synoviocytes.
Arthritis Rheum Feb; 40(2): 226-236

Dinareello C.A. (1997)

Interleukin-1.
Cytokine Growth Factor Rev 8: 253-265

Duffy A.A., Martin M.M. und Elton T.S. (2004)

Transcriptional regulation of the AT₁ receptor gene in
immortalized human trophoblast cells.
Biochimica et Biophysica Acta 1680 158-170

Eberhardt W., Kunz D. und Pfeilschifter J. (1994)

Pyrrolidine dithiocarbamate differentially affects interleukin 1 beta- and cAMP-
induced nitric oxide synthase expression in rat renal mesangial cells.
Biochem Biophys Res Commun. Apr 15;200(1): 163-70

- Ermert M., Ruppert C., Gunther A., Duncker H.R., Seeger W. und Ermert L. (2002)**
Cellspecific nitric oxide synthase-isoenzyme expression and regulation in response to endotoxin in intact rat lungs.
 Lab Invest 82 (4), 425-441
- Förstermann U., Closs E.I., Pollock J.S., Nakane M., Schwarz P., Gath I. und Kleinert H. (1994)**
Nitric oxide isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions.
 Hypertension 23: 1121-1131
- Fox G.A., Paterson N.A.M. und McCormack D.G. (1994)**
Effect of inhibition of NO synthase on vascular reactivity in a rat model of hyperdynamic sepsis.
 Am J Physiol 267: H1377-1382
- Freudenberg M.A., Meier-Dieter U., Staehelin T. und Galanos C. (1991)**
Analysis of LPS released from Salmonella abortus equi in human serum.
 Microb Patho 10: S.93-104
- Fujisawa K., Aono H., Hasunuma T., Yamamoto K., Mita S. und Nishioka K. (1996)**
Activation of transcription factor NF-kappa B in human synovial cells in response to tumor necrosis factor alpha.
 Arthritis Rheum Feb; 39(2): 197-203
- De Gasparo M., Catt K.J., Inagami T., Wright J.W. und Unger Th. (2000)**
International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors.
 Pharmacol Rev 52: 415-472
- Ghosh A.K., Bhattacharyya S., Mori Y. und Varga J. (2006)**
Inhibition of Collagen Gene Expression by Interferon- γ : Novel Role of the CCAAT/Enhancer Binding Protein β (C/EBP β).
 Journal of Cellular Physiology 207: 251-260
- Ghosh S., May M.J. und Kopp E.B. (1998)**
NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses.
 Annu Rev Immunol 16: 225-60
- Glauser M.P., Zanetti G., Baumgartner J.D. und Cohen J. (1991)**
Septic shock: pathogenesis.
 Lancet (338) [8769], S. 732-736
- Goeddel D.V., Aggarwal B.B., Gray P.W., Leung D.W., Nedwin G.E., Palladino M.A., Patton J.S., Pennica D., Shepard H.M., Sugarman B.J. et al. (1986)**
Tumor necrosis factors: gene structure and biological activities.
 Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51 Pt 1: 597-609

- Goodwin B.L., Pendleton L.C., Levy M.M., Solomonson L.P. und Eichler D.C. (2007)**
Tumor necrosis factor- α reduces argininosuccinate synthase expression and nitric oxide production in aortic endothelial cells.
 Am J Physiol Heart Circ Physiol 293: H1115–H1121
- Guha M. und Mackman N. (2001)**
LPS induction of gene expression in human monocytes.
 Cell Signal Feb; 13(2): 85-94
- Gurantz D., Cowling R.T., Villarreal F.J. und Greenberg B.H. (1999)**
Tumor necrosis factor- α upregulates angiotensin II type 1 receptors on cardiac fibroblasts.
 Circ Res 85: 272-279
- Hack C.E., Aarden L.A. und Thijs L.G. (1997)**
Role of cytokines in sepsis.
 Adv Immunol 66, 101-95
- Hickey M.J., Sharkey K.A., Sihota E.G., Reinhardt P.H., MacMicking J.D., Nathan C. und Kubes P. (1997)**
Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia.
 FASEB J 11 (12), 955-64
- Hollenberg S.M., Broussard M., Osman J. und Parrillo J.E. (2000)**
Increased microvascular reactivity and improved mortality in septic mice lacking inducible nitric oxide synthase.
 Circ Res 86 (7), 774-778
- Hollenberg S.M., Tangora J.J., Piotrowski M.J., Easington C. und Parrillo J.E. (1997)**
Impaired microvascular vasoconstrictive responses to vasopressin in septic rats.
 Crit Care Med 25: 869-873
- Ichiki T., Usui M., Kato M., Funakoshi Y., Ito K., Egashira K. und Takesgita A. (1998)**
Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide.
 Hypertension 31: 342-348
- Ikeda Y., Takeuchi K., Kato T., Taniyama Y., Sato K., Takahashi N., Sugawara A. und Ito S. (1999)**
Transcriptional Suppression of Rat Angiotensin AT1a Receptor Gene Expression by Interferon- γ in Vascular Smooth Muscle Cells.
 Biochemical and Biophysical Research Communications 262: 494-498
- Jain S., Shah M., Li Y., Vinukonda G., Sehgal P.B. und Kumar A. (2006)**
Upregulation of human angiotensinogen (AGT) gene transcription by interferon- γ :
Involvement of the STAT1-binding motif in the AGT promoter.
 Biochimica et Biophysica Acta 1759: 340-347

Johnson G.L. und Lapadat R. (2002)

Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases.
Science 298, 1911

Johnson P.F. und Williams S.C. (1994)

CCAAT/enhancer binding (C/EBP) proteins.
In: Tronche F, Yaniv M, editors. Liver gene expression.
Austin, TX: RG Landes Co. pp 771-795

Kambe T., Kinjyo N., Hiruki H. und Kubo T. (2004)

BASAL TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF RAT ATI ANGIOTENSIN II RECEPTOR GENE EXPRESSION
Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 31, 96-100

Kopp E., Medzhitov R., Carothers J., Xiao C., Douglas I., Janeway C.A. und Ghosh S. (1999)

ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway.
Genes Dev Aug 15; 13(16): 2059-2071

Kroncke K.D., Fehsel K. und Kolb-Bachofen V. (1995)

Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities.
Biol Chem Hoppe Seyler Jun; 376(6): 327-343

Lee S.H., Soyoola E., Chanmugam P., Hart S., Sun W., Zhong H., Liou S., Simmons D. und Hwang D. (1992)

Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide.
J Biol Chem Dec 25; 267 (36): 25934-25938

Liu S.F., Adcock I.M., Old R.W., Barnes P.J. und Evans T.W. (1993)

Lipopolysaccharide treatment in vivo induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA.
Biochem Biophys Res Commun 196: 1208-1213

Lyons-Giordano B., Pratta M.A., Galbraith W., Davis G.L. und Arner E.C. (1993)

Interleukin-1 differentially modulates chondrocyte expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase A2.
Exp Cell Res May; 206(1): 58-62

Ma Z., Chang M.J., Shah R.C. und Benveniste E.N. (2005)

Interferon- γ -activated STAT-1 α suppresses MMP-9 gene transcription by sequestration of the coactivators CBP/p300.
J Leukoc Biol 78 (2): 515-23

Männel D.N., Janicke R., Westenfelder U., Echtenacher B., Kist A. und Falk W. (1990)

Tumor-induced tumor necrosis factor production in macrophages.
Lymphokine Res 9: 485-489

- McCallum K.L., Schoenhals G., Laakso D., Clarke B. und Whitfield C. (1989)**
A high-molecular-weight fraction of smooth lipopolysaccharide in Klebsiella serotype O1:K20 contains a unique O-antigen epitope and determines resistance to nonspecific serum killing.
 Infect Immun Dec; 57 (12): 3816-3822
- Moerer O. und Burchardi H. (2004)**
Epidemiologie und Kosten der Sepsis.
 klinikarzt 33 (6): 177-180
- Moncada S., Palmer R.M. und Higgs E.A. (1991)**
Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology.
 Pharmacol Rev 1991 Jun; 43(2): 109-42
- Narumi S., Tebo J.M., Finke J.H. und Hamilton T.A. (1992)**
IFN- γ AND IL-2 COOPERATIVELY ACTIVATE NF κ B IN MURINE PERITONEAL MACROPHAGES.
 The Journal of Immunology Vol. 149, 529-534, No. 2, July 15
- Nathan C. (1992)**
Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells.
 FASEB J 6: 3051-3064
- Nathan C. und Xie Q.W. (1994)**
Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls.
 Cell Sep 23; 78(6): 915-918
- Nelson S, Stewart L. und Traber L. (1991)**
Endotoxin-induced alterations in contractility of isolated blood vessels from sheep.
 Am J Physiol 260: H1790-H1794
- Newton R., Kuitert L.M.E., Bergmann M., Adcock I.M. und Barnes P.J. (1997)**
Evidence for involvement of NF- κ B in the transcriptional control of COX-2 gene expression by IL-1 β .
 Biochem Biophys Res Commun 237: 28
- Nithipatikom K., Holmes B.B., McCoy M.J., Hillard C.J. und Campbell W.B. (2004)**
Chronic administration of nitric oxide reduces angiotensin II receptor type 1 expression and aldosterone synthesis in zona glomerulosa cells.
 Am J Physiol Endocrinol Metab 287: E820-E827
- Onishi H.R., Pelak B.A., Gerckens L.S., Silver L.L., Kahan F.M., Chen M.H., Patchett A.A., Galloway S.M., Hyland S.A., Anderson M.S. und Raetz C.R. (1996)**
Antibacterial agents that inhibit lipid A biosynthesis.
 Science Nov 8; 274 (5289): 939-940
- Pahl H.L. (1999)**
Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors.
 Oncogene Nov 22; 18(49): 6853-66

Palsson-McDermott E.M. und O'Neill L.A. (2004)

Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4.
Immunology Oct; 113(2): 153-62

Parrillo J.E. (1993)

Pathogenetic mechanisms of septic shock.
N Engl J Med May 20; 328(20): 1471-1477

Pedoto A., Tassiopoulos A.K., Oler A. et al. (1998)

Treatment of septic shock in rats with nitric oxide synthase inhibitors and inhaled nitric oxide.
Crit Care Med 26: 2021-2028

Pfeiffer R. (1892)

Untersuchungen über das Cholera Gift.
Zf. f. Hygiene (11): Seite 393-412

Pfeilschifter J., Eberhardt W., Hummel R., Kunz D., Mühl H., Nitsch D., Plüss C. und Walker G. (1996)

Therapeutic strategies for the inhibition of inducible nitric oxide synthase – potential for a novel class of anti-inflammatory agents.
Cell Biol Int 20: 51-58

Phelps C.B., Sengchanthalangsy L.-L., Malek S. und Gosh G. (2000)

Mechanism of κB binding by Rel/NF- κB dimers.
J Biol Chem 275 (32): 24392

Poltorak A., He X., Smirnova I. et al. (1998)

Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene.
Science 282: 2085-2088

Ramana C.V., Grammatikakis N., Chernov M., Nguyen H., Goh K.C., Williams B.R.G. und Stark G.R. (2000)

Regulation of c-myc expression by IFN- γ through Stat1-dependent and -independent pathways
The EMBO Journal Vol.19 No.2 pp. 263-272

Rensing H. und Bauer M. (2001)

Multiorganversagen.
Mechanismen, klinische Manifestation und Therapiestrategien.
Anaesthesist 50: 819-841

Rietschel E.T. und Brade H. (1992)

Bacterial endotoxins.
Sci Am (267) [2], Seite 54-61

- Rietschel E.T., Brade H., Brade L., Kaca W., Kawahara K., Lindner B., Lüderitz T., Tomita T., Schade U. und Seydel U. (1985)**
Newer aspects of the chemical structure and biological activity of bacterial endotoxins.
 Prog Clin Biol Res 189: 31-51
- Rietschel E.T., Brade L., Brandenburg K., Flad H.D., de Jong-Leuveninck J., Kawahara K., Lindner B., Loppnow H., Luderitz T. und Schade U. (1987)**
Chemical structure and biologic activity of bacterial and synthetic lipid A.
 Rev Infect Dis Sep-Oct; 9 Suppl 5: S527-536
- Robbins R.A., Springall D.R., Warren J.B., Kwon O.J., Buttery L.D., Wilson A.J., Adcock I.M., Riveros-Moreno V., Moncada S., Polak J. et al. (1994)**
Inducible nitric oxide synthase is increased in murine lung epithelial cells by cytokine stimulation.
 Biochem Biophys Res Commun Feb 15; 198(3): 835-843
- Saldeen J. und Welsh N. (1994)**
INTERLEUKIN-1 β INDUCED ACTIVATION OF NF- κ B IN INSULIN PRODUCING RINm5F CELLS IS PREVENTED BY THE PROTEASE INHIBITOR N α -p-TOSYL-L-LYSINE CHLOROMETHYLKETONE.
 Biochem Biophys Res Commun Vol. 203, No. 1, pages 149-155
- Sasamura H., Nakazyto Y., Hayashida T., Kitamura Y., Hayashi M. und Saruta T. (1997)**
Regulation of vascular type 1 angiotensin receptors by cytokines.
 Hypertension 30: 35-41
- Schaller M.D., Waeber B., Nussberger J. und Brunner H.R. (1985)**
Angiotensin II, vasopressin, and sympathetic activity in conscious rats with endotoxemia.
 Am J Physiol 249: H1086-H1092
- Schottmüller H. (1914)**
Wesen und Behandlung der Sepsis.
 Verh Dtsch Ges Inn Med 31: 257
- Schroder K., Hertzog P.J., Ravasi T. und Hume D.A. (2004)**
Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions.
 J Leukoc Biol. 75(2): 163-89
- Schuster H.P. und Müller-Werdan U. (1999)**
Definition und Diagnose von Sepsis und Multiorganversagen.
In: Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen.
 Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 3.Aufl., S. 3-26
- Scott J.A. und McCormack D.G. (1999)**
Selective in vivo inhibition of inducible nitric oxide synthase in a rat model of sepsis.
 J Appl Physiol 86: 1739-1744

- Seger R. und Krebs E.G. (1995)**
The MAPK signaling cascade.
 FASEB J Jun;9(9): 726-35
- Sen R. und Baltimore D. (1986)**
Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences.
 Cell 46 (5): 705-716
- Senftleben U. und Karin M. (2002)**
The IKK/NF-kappa B pathway.
 Crit Care Med 30 (Suppl 1): S18-26
- Sharma B. und Iozzo R.V. (1998)**
Transcriptional silencing of perlecan gene expression by interferon-gamma.
 J Biol Chem. Feb 20; 273(8): 4642-6
- Sims J.E. und Dower S.K. (1994)**
Interleukin-1 receptors.
 Eur Cytokine Netw 5: 539-546
- Smith W.L., DeWitt D.L. und Garavito R.M. (2000)**
Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology.
 Annu Rev Biochem 69: 145-182
- Somerville J.E. Jr., Cassiano L., Bainbridge B., Cunningham M.D. und Darveau R.P. (1996)**
A novel Escherichia coli lipid A mutant that produces an antiinflammatory lipopolysaccharide.
 J Clin Invest Jan 15; 97 (2): 359-365
- Starzynski R.R., Gonçalves A.S., Muzeau F., Tyrolczyk Z., Smuda E., Drapier J.-C., Beaumont C. und Lipinski P. (2006)**
STAT5 proteins are involved in down-regulation of iron regulatory protein 1 gene expression by nitric oxide.
 Biochem J 400: 367-375
- Tarpey S.B., Bennett T., Randall M.D. und Gardiner S.M. (1998)**
Differential effects of endotoxaemia on pressor and vasoconstrictor actions of angiotensin II and arginine vasopressin in conscious rats.
 Br J Pharmacol 123: 1367-1374
- Teale M. und Atkinson A.M. (1994)**
L-Canavanine restores blood pressure in a rat model of endotoxin shock.
 Eur J Pharmacol 271: 87-92
- Thiemermann C., Wu C.C., Szabó C., Perretti M. und Vane J.R. (1993)**
Role of tumour necrosis factor in the induction of nitric oxide synthase in a rat model of endotoxin shock.
 Br J Pharmacol 110: 177-182

- Thornberry N.A., Bull H.G., Calaycay J.R., Chapman K.T., Howard A.D., Kostura M.J., Miller D.K., Molineaux S.M., Weidner J.R., Aunins, J. et al. (1992)**
A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes.
 Nature 356: 768-774
- Tibbles L.A. und Woodgett J.R. (1999)**
The stress-activated protein kinase pathways.
 Cell Mol Life Sci Aug 15; 55 (10): 1230-54
- Todorov V.T., Völkl S., Müller M., Bohla A., Klar J., Kunz-Schughart L.A., Hehlhans T. und Kurtz A. (2004)**
Tumor Necrosis Factor- α Activates NF κ B to Inhibit Renin Transcription by Targeting cAMP-responsive Element.
 THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
 Vol. 279, No. 2, Issue of January 9, pp. 1458-1467
- Topley N., Petersen M.M., Mackenzie R., Neubauer A., Stylianou E., Kaever V., Davies M., Coles G.A., Jorres A. und Williams J.D. (1994)**
Human peritoneal mesothelial cell prostaglandin synthesis: induction of cyclooxygenase mRNA by peritoneal macrophage-derived cytokines.
 Kidney Int Sep; 46(3): 900-909
- Trinchieri G. (1989)**
Biology of natural killer cells.
 Adv Immunol 47: 187-376
- Vassalli P. (1992)**
The pathophysiology of tumor necrosis factors.
 Annu Rev Immunol 10, 411-452
- Wang X., Nickenig G. und Murphy T.J. (1997)**
The Vascular Smooth Muscle Type I Angiotensin II Receptor mRNA Is Destabilized by Cyclic AMP-Elevating Agents.
 Molecular Pharmacology 52: 781-787
- Wassmann S. und Nickenig G. (2006)**
Pathophysiological regulation of the AT₁-receptor and implications for vascular disease.
 Journal of Hypertension 24 (suppl 1): S15-S21
- Wen Z., Zhong Z. und Darnell J.E., Jr (1995)**
Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation.
 Cell, 82, 241-250

Xiao Y.Q., Malcolm K., Worthen G.S., Gardai S., Schiemann W.P., Fadok V.A., Bratton D.L. und Henson P.M. (2002)

Cross-talk between ERK and p38 MAPK mediates selective suppression of pro-inflammatory cytokines by transforming growth factor-beta.

J Biol Chem Apr 26; 277 (17): 14884-93

Xie Q.W., Kashiwabara Y. und Nathan C. (1994)

Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase.

J Biol Chem 269 (7): 4705-4708

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Act. D	Actinomycin D
Amp	Ampicillin
AP-1	Aktivator Protein-1
AT _{1a} R	AT _{1a} -Rezeptor
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AVSMC	Aortic Vascular Smooth Muscle Cells
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
CD14	cluster of differentiation 14
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
CREB	cAMP response element-binding
Da	Dalton
DETA-NO	(Z)-1-[2-(2-Aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazene-1-ium-1,2-diolate // DETA NONOate // NOC-18
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2-Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
Elk-1	Elk1 member of ETS oncogene family
EtOH	Ethanol
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
IFN- γ	Interferon- γ
I- κ B	Inhibitorprotein κ B
IL-1 β	Interleukin-1 β
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IRAK	IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase
kb	Kilobasenpaar(e)

L	Liter
LB	Luria Broth
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
L-NAME	L-Nitrosoaminomethylester
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase)
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mM	Millimolar
min	Minute
M-MLV	Murine-Moloney-Leukemia-Virus
µmol	Mikromol
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MyD88	Myeloid-Differenzierungsprotein
NF-κB	Nuklear Faktor κB
ng	nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
NOS II	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase, iNOS
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge x nm
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDTC	Pyrrolidin-Dithiocarbamat
PG	Peptidoglykan
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
siRNA	small interfering RNA
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SNAP	S-Nitroso-N-Acetyl-DL-Penicillamin
T	Thymin
Taq	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TLR-4	Toll-like-Rezeptor 4
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
TRAF6	TNF Rezeptor assoziierter Faktor 6
tRNA	transfer-RNA
U	Unit
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UV	ultravioletter Bereich elektromagnetischer Strahlung
Vol	Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid

PUBLIKATIONEN

Eingereichte Manuskripte

Kurt B., Schmidt C., MD, Höcherl K., PhD, Kurtz A., MD und Bucher M., MD
Silencing of NF- κ B abrogates cytokine-dependent downregulation of vasoconstrictor receptors and prevents cardiovascular failure in experimental sepsis.

Schmidt C., MD, Höcherl K., PhD, Kurt B. und Bucher M., MD
NF- κ B-dependent Induction of Cytokines provokes CLP-induced Circulatory Failure by Downregulation of Vasopressin V1A-Receptors.

Poster

Kurt B. und Bucher M.
AT₁-Rezeptorexpression während schwerer experimenteller Entzündung.
36. Bayerische Anästhesietage vom 6. bis 7. Oktober 2006 in Würzburg

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die während der letzten vier Jahre zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz für die Vergabe des interessanten Themas und sein dauerndes Interesse am Fortgang meiner Arbeit. Seine Anregungen und seine aufmunternden Worte haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Dr. Michael Bucher danke ich für die Bereitstellung der benötigten Arbeitsmaterialien und dafür, daß er immer ein offenes Ohr für meine Sorgen hatte.

Herrn Dr. Klaus Höcherl und Michael Desch danke ich für ihre aufmunternden Worte in schwierigen Situationen und das Korrekturlesen des vorliegenden Manuskripts.

Frau Ingrid Fuchs danke ich sehr für ihre Hilfe bei den Laborarbeiten. Wenn sie nicht gewesen wäre, würde ich noch immer im Labor stehen.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für das angenehme Arbeitsklima, für die Freundlichkeit und die kollegiale Atmosphäre.

Meiner Cousine Dilek danke ich dafür, daß sie mich immer wieder aufgebaut und unterstützt hat, wo es nur ging.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, ohne die ich es nie soweit gebracht hätte.

Baba ve anne, her şey için çok teşekkürler. Benim için yaptıklarınızı hiçbir zaman unutmuyacam. Auch meinen Geschwistern danke ich, denn sie haben mir in schweren Zeiten Zuversicht gegeben. Danke.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 17.01.2008

Birgül Kurt

